

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Contribution à la mise au point d'un vecteur de transfection de type polymère cationique

François, Delphine

Award date:
2002

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**Contribution à la mise au point d'un vecteur de transfection
de type polymère cationique**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Delphine FRANCOIS

Juin 2002

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet @fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Contribution à la mise au point d'un vecteur de transfection de type polymère cationique

FRANCOIS Delphine

Résumé

Ce mémoire s'inscrit dans le cadre d'un programme de recherche financé par la Région Wallonne. Ce projet a pour but la mise au point de nouveaux polycations synthétiques, non toxiques et hémocompatibles destinés à la vectorisation d'ADN dans les cellules de la paroi vasculaire. Le vecteur proposé est un poly(MADAM) (méthacrylate de diméthylaminoéthyl) composé d'une dorsale de méthacrylate sur laquelle peuvent venir se greffer différentes fonctions comme des peptides de ciblage, du PEO, ... afin d'augmenter le taux de transfection. L'optimisation de ces vecteurs synthétiques suppose un effort multidisciplinaire. Ce projet réunit 3 laboratoires : le SMPC (UMH) synthétisant les polymères de manière contrôlée ; le LBPG (ULG) s'occupant de la caractérisation physico-chimique et de l'évaluation de la biocompatibilité des complexes vecteurs/ADN et l'URBC. Une première partie de ce travail a consisté à **optimiser les conditions de transfection des polymères de poly(MADAM)**. Le tampon de complexation, la qualité de l'ADN et le mode de préparation des complexes se sont avérés des paramètres critiques. Le protocole de transfection et la structure du polymère sont également importants. Nous avons donc testé l'influence de la longueur de la chaîne de MADAM et d'une amorce de PEO sur l'efficacité de transfection. La deuxième partie de ce mémoire a consisté à **caractériser le cheminement intracellulaire des complexes polycations/ADN** à l'aide de la microscopie confocale. Les polymères testés entrent dans la cellule par des structures « endosome-like » et il est possible de détecter, de manière non ambiguë dans le noyau, l'ADN plasmidique exogène.

Mémoire de licence en Sciences biologiques

Juin 2002

Promoteur: M. Raes

Je remercie tous les membres du projet Polyplex avec lesquels j'ai travaillé et plus spécialement Sabine Pirotton pour ses conseils avisés, sa disponibilité, ainsi que tout ce qu'elle m'a appris tout au long de notre collaboration.

Je tiens à exprimer ma gratitude à Martine Raes, promotrice de ce mémoire, pour son encadrement, sa confiance et ses encouragements.

Je remercie également tous les professeurs qui ont contribué à ma formation.

Enfin, j'ai une pensée pour mes parents et toutes les personnes qui, de près ou de loin, m'ont aidée et soutenue durant mon parcours universitaire.

Abréviations

AAV	virus adéno-associé
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	acide désoxyribonucléique complémentaire
ATRP	Atom Transfert Radical Polymerization
BSA	bovine serum albumin
CFTR	cystic fibrosis transmembrane regulator
D	polydispersité
Da	dalton
DEAE-dextran	diéthylaminoéthyl-dextran
DMEM	Dulbecco's Modified Eagles Medium.
DMRIE	bromure de 1,2-dimyristyloxypropyl-3-diméthyl-hydroxyéthylammonium
DOPE	dioléoyl phosphatidyléthanolamine
DOSPA	trifluoroacétate de 2,3-dioléyloxy-N-[2(sperminecarboxamido)éthyl]-N, N-diméthyl-1-propanaminium
DOTAP	chlorure de N-[1-(2,3-dioléoyloxy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium
DOTMA	bromure de 2,3-dioléyloxypropyl-1 tri-méthylammonium
DS	déviat ion standard
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	acide éthylènedinitrilotétraacétique
FBS	Sérum de veau fœtal
FUNDP	Faculté universitaire Notre-Dame de la Paix Namur
GAGs	glycosamino-glycanes
HA	hémagglutinine
HBS	tampon HEPES
HEPES	acide N-[2-Hydroxyéthyl]pipérazine-N'-[2-éthanesulfonique]
HIV	virus d'immunodéficience humaine
LAL	lysate de Limule
LB	Lennox Broth
LBPG	laboratoire de biochimie et de physiologie générale
LDL	Low Density Lipoprotein
LPGA	poly [Acide Lactique-L-glycolique]
MAPEO	méthacrylate de poly(éthylèneglycol) méthyl éther
Mn	masse moyenne en nombre
MOPS	acide 3-[N-morpholino] propanesulfonique
M-PER	Mammalian Protein Extraction Reagent
NLS	Nuclear Localisation Signal
NPC	Nuclear Pore Complex
PAMAM	dendrimères polyamidoaminés
PBS	phosphate buffer saline
PBS	tampon phosphate
PEG	polyéthylèneglycol

PEI	polyéthylèneimine
PEO	polyoxyde d'éthylène
PIPES	acide pipérazine-N,N'-bis (2-éthanesulfonique)
PLB	Passive Lysis Buffer
PLL	poly-L-Lysine
pNA	p-nitroaniline
poly(MADAM)	(méthacrylate de 2-diméthylamino)éthyl
SF	SuperFect
SMPC	Service des Matériaux Polymères et Composites
β-gal	béta-galactosidase
SV 40	virus simien 40
ULg	Université de Liège
UMH	Université Mons-Hainaut
URBC	Unité de Recherche en Biologie Cellulaire

SOMMAIRE

I	INTRODUCTION	4
I.1	LA TRANSFECTION ET SES DIFFICULTES	5
I.1.1	Définitions.....	5
I.1.2	Les barrières.....	6
I.1.2.1	In vitro	6
I.1.2.2	la thérapie génique « <i>in vivo</i> ».....	8
I.2	LES VECTEURS DE TRANSFECTION.....	9
I.2.1	L'ADN nu.....	9
I.2.2	Les vecteurs viraux.....	10
I.2.2.1	Les rétrovirus	10
I.2.2.2	Les adénovirus.....	11
I.2.2.3	Les virus adéno-associés (AAV).....	12
I.2.2.4	Les autres virus.....	12
I.2.3	Les vecteurs non viraux.....	12
I.2.3.1	Le Phosphate de Ca^{2+} et DEAE-Dextran.....	13
I.2.3.2	Les liposomes et lipides cationiques	13
I.2.3.3	Les polymères	15
I.2.3.3.1	La poly-L-Lysine (PLL)	15
I.2.3.3.2	La polyéthylèneimine (PEI).....	15
I.2.3.3.3	Les dendrimères polyamidoaminés (PAMAM).....	16
I.2.3.3.4	Les polymères dérivés de dorsale méthacrylate.....	17
I.2.3.3.5	Le chitosan.....	17
I.2.3.3.6	Les nanoparticules de poly [Acide Lactique-L-glycolique]	18
I.2.3.4	Divers.....	19
I.3	COMMENT SURMONTER LES DIFFERENTES BARRIERES	20
I.3.1	L'opsonisation et activation du complément.....	20
I.3.2	L'internalisation dans la cellule.....	20
I.3.3	Le relargage de l'endosome	22
I.3.4	Le transport dans le cytoplasme	23
I.3.5	L'entrée dans le noyau	24
I.4	LE PROJET POLYPLEX	26
I.5	LE BUT DU MEMOIRE	29
II	MATÉRIELS ET MÉTHODES	30
II.1	CULTURE CELLULAIRE	31
II.1.1	Matériel et solutions :.....	31
II.1.2	Méthode :.....	31
II.2	PREPARATION D'ADN PCMV β	32
II.2.1	Transformation bactérienne.....	33
II.2.1.1	Matériel.....	33
II.2.1.2	Méthode	34
II.2.1.2.1	Préparation des bactéries CaCl_2 compétentes	34
II.2.1.2.2	Transformation bactérienne	34

II.2.2	<i>Maxi préparation d'ADN plasmidique</i>	35
II.2.2.1	<i>Matériel</i>	35
II.2.2.2	<i>Méthode</i>	36
II.2.2.2.1	<i>Culture des bactéries</i>	36
II.2.2.2.2	<i>Purification d'ADN (selon les spécifications du kit)</i>	36
II.3	<i>CARACTERISATION DE L'ADN PREPARE</i>	37
II.3.1	<i>Quantification de l'ADN</i>	37
II.3.2	<i>Restriction de l'ADN</i>	37
II.3.2.1	<i>Matériel</i>	37
II.3.2.2	<i>Méthode</i>	38
II.4	<i>DOSAGE D'ENDOTOXINES</i>	38
II.4.1	<i>Matériel</i>	39
II.4.2	<i>Méthode</i>	39
II.5	<i>PREPARATION DE POLYMERES</i>	40
II.6	<i>TRANSFECTION DES CELLULES COS-7 PAR LES COMPLEXES POLYMER/PCMVβ</i> 40	
II.6.1	<i>Matériel</i>	41
II.6.2	<i>Méthode</i>	42
II.6.2.1	<i>Ensemencement des cellules :</i>	42
II.6.2.2	<i>Transfection :</i>	42
II.6.2.3	<i>Révélation de la β-galactosidase</i>	42
II.6.2.3.1	<i>En colorimétrie</i>	42
II.6.2.3.2	<i>En histochimie</i>	43
II.7	<i>DOSAGE DE PROTEINES (FOLIN)</i>	43
II.7.1	<i>Matériel</i>	44
II.7.2	<i>Méthode</i>	44
II.8	<i>TECHNIQUE D'IMMUNOCYTOCHIMIE</i>	45
II.8.1	<i>Matériel</i>	45
II.8.2	<i>Méthode</i>	46
III	RESULTATS	48
III.1	<i>PRESENTATION GENERALE DES POLYPLEXES ET PROTOCOLES UTILISES</i>	50
III.1.1	<i>Choix du gène rapporteur</i>	50
III.1.2	<i>Choix de l'agent de transfection de référence</i>	50
III.1.3	<i>Protocole de transfection avec les polymères</i>	51
III.1.4	<i>Caractéristiques des polymères utilisés</i>	52
III.2	<i>RECHERCHE DES CONDITIONS OPTIMALES DE TRANSFECTION AVEC LES POLYMERES</i>	54
III.2.1	<i>Influence du rapport polymère/ADN sur le taux de transfection</i>	54
III.2.1.1	<i>Méthode colorimétrique</i>	54
III.2.1.2	<i>Méthode histochimique</i>	55
III.2.2	<i>Influence du tampon sur le taux de transfection</i>	55
III.2.3	<i>Influence de la qualité de l'ADN sur le taux de transfection</i>	56
III.2.3.1	<i>Présence d'endotoxines</i>	56
III.2.3.2	<i>Topologie de l'ADN : forme superenroulée et forme ouverte</i>	58
III.2.4	<i>Influence du mode de préparation des complexes sur le taux de transfection</i>	58
III.2.5	<i>En résumé</i>	59
III.3	<i>INFLUENCE DE LA STRUCTURE DES POLYMERES SUR LE TAUX DE TRANSFECTION</i> 60	

III.3.1	<i>Influence de la longueur de la chaîne de poly(MADAM) sur le taux de transfection.....</i>	60
III.3.2	<i>Influence d'une amorce PEO sur le taux de transfection.....</i>	61
III.3.3	<i>Conclusions.....</i>	63
III.4	CARACTERISATION INTRACELLULAIRE DU CHEMINEMENT DES COMPLEXES	64
III.4.1	<i>Résultats.....</i>	64
III.4.2	<i>Conclusions.....</i>	67
IV	DISCUSSION , CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	68
IV.1	OPTIMISATION DES PARAMETRES DE TRANSFECTION	70
IV.2	INFLUENCE DE LA STRUCTURE DU POLYMERE SUR LE TAUX DE TRANSFECTION	71
IV.2.1	<i>Influence de la longueur de la chaîne de MADAM.....</i>	71
IV.2.2	<i>Influence d'une amorce PEO.....</i>	72
IV.3	ETUDE DU CHEMINEMENT INTRACELLULAIRE DES COMPLEXES EN MICROSCOPIE CONFOCALE.....	73
IV.4	CONCLUSIONS.....	75
V	BIBLIOGRAPHIE	76

I INTRODUCTION

I.1 La transfection et ses difficultés

I.1.1 Définitions

La **transfection** est l'introduction de matériel génétique exogène dans le génome de cellules eucaryotes. Outre les plasmides, la transfection peut également employer d'autres supports génétiques tel que l'ARN (Malone et al, 1989) et des oligonucléotides antisens (Wagner et al, 1993). Ces derniers permettent de bloquer l'expression protéique d'un gène en s'appariant à des séquences anticcomplémentaires intracellulaires (« stratégie antisens »).

La transfection peut être réalisée sur des cellules en culture (*in vitro*) ou directement dans l'organisme (*in vivo*). La **thérapie génique** n'est autre que l'application de cette technique à la médecine, où l'ADN (ou l'ARN) introduit vise à supplanter un gène déficient, à inhiber son expression ou à introduire un gène réparateur, voir même introduire un gène dit suicide. Cette nouvelle approche thérapeutique ouvre de grandes perspectives pour le traitement de diverses pathologies comme les maladies dégénératives, la mucoviscidose, les affections cardiovasculaires, les maladies infectieuses ou le cancer.

Malheureusement, les résultats obtenus depuis 1990 (début des essais cliniques), sont bien en deçà des espérances.

Le problème vient principalement du fait qu'il est très difficile de **vectoriser** le matériel jusqu'à la cellule cible. Il y a deux raisons majeures à cela :

- l'ADN est une molécule anionique, hydrophile et de très grand poids moléculaire qui d'elle même n'a pas tendance à traverser les membranes biologiques,
- l'ADN va rencontrer de nombreux obstacles ou barrières sur son chemin vers le noyau.

C'est pourquoi de nombreux laboratoires se focalisent actuellement sur la mise au point de **techniques physiques** ou sur la synthèse de **vecteurs** qui permettront à cet ADN d'entrer dans les cellules et d'atteindre le noyau pour y être transcrit.

Nous allons d'abord décrire les différents obstacles que rencontrera l'ADN sur son trajet vers le noyau. Nous verrons ensuite, quels types de vecteurs sont utilisés jusqu'à présent et comment ils sont « désignés » pour surmonter ces barrières.

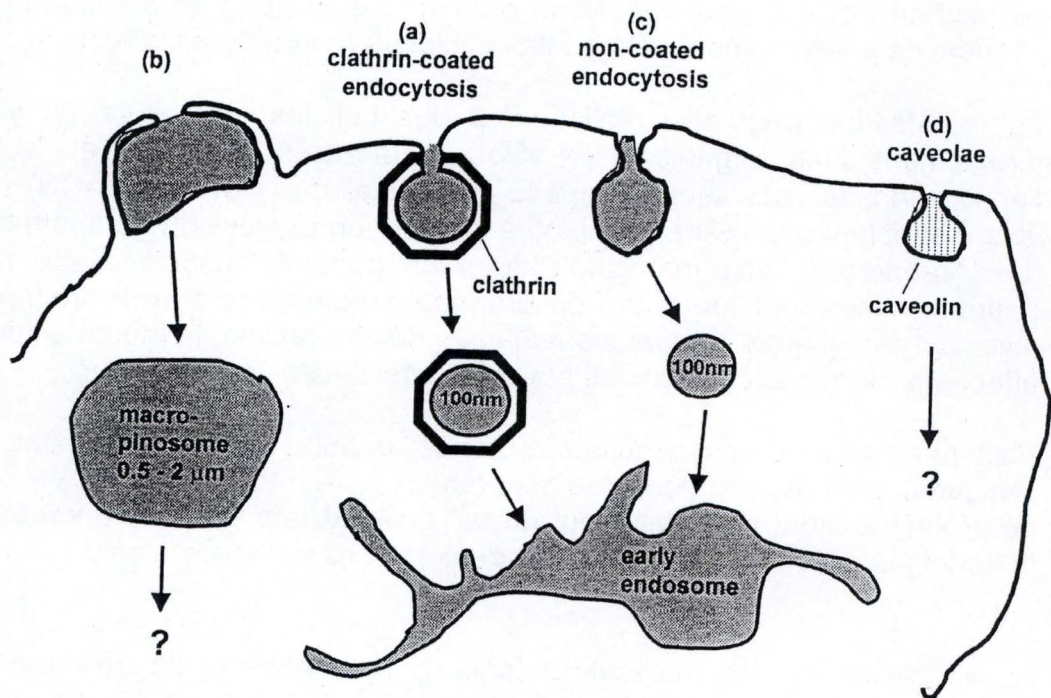


Figure 1.1: Schéma des multiples voies d'endocytose dans les cellules de mammifères.

(a) l'endocytose médiée par des puits tapissés de clathrine (b) la macropinocytose (c) l'endocytose indépendante de la clathrine (d) les cavéoles (Lamaze et Schmid, 1995).

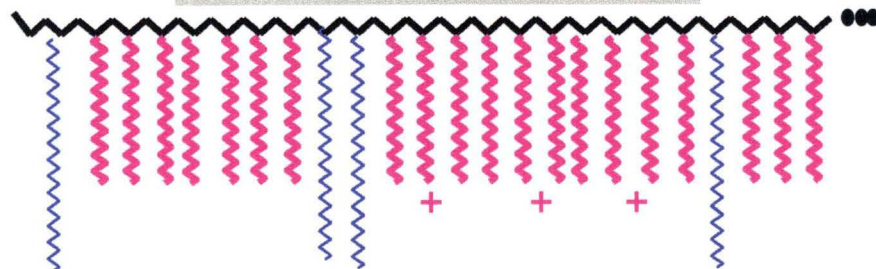
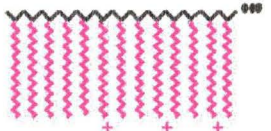



Tableau récapitulatif des polymères utilisés

Type	Nom	Polymérisation		Mn Da	D
		Conv.	ATRP		
Poly(MADAM) 	NAPA C18	x		91 400	4,25
	NAPA C39 b		x	19 600	1,23
	SEMO B22		x	13 000	1,35
	MIWA A9		x	19 700	1,15
	MIWA A23		x	26 400	1,17
	MIWA A25		x	37 500	1,18
Poly(MADAM) avec amorceur PEO de 10 	MIWA A33		x	18 900	1,23
	SEMO B30		x	24 000	1,23
	MIWA A35		x	30 800	1,3

I.1.2 Les barrières

I.1.2.1 In vitro

Dans les expériences *in vitro* sur cellules en culture, l'ADN est exposé directement aux cellules cibles. La première barrière qu'il rencontre est donc la **membrane plasmique**. La surface externe de cette membrane est chargée négativement tout comme l'ADN, porteur de charges négatives sur les groupements phosphates. L'interaction de ce dernier avec la membrane est peu aisée étant donné les forces électrostatiques répulsives. Pour surmonter ce problème, les chercheurs développent des méthodes chimiques qui permettent de produire des vecteurs chargés positivement qui condensent l'ADN, rendant le complexe chargé positivement. L'interaction entre les complexes et la membrane plasmique peut dès lors s'effectuer. Outre les méthodes chimiques, il existe également des méthodes mécaniques ou électriques visant à l'incorporation de l'ADN nu. Celles-ci seront développées au point I.2.1.

L'entrée de la plupart des macromolécules dans les cellules se fait par un processus appelé endocytose. C'est un terme général regroupant plusieurs mécanismes (Gruenberg et Maxfield, 1995 ; Robinson et al, 1996) quelque peu différents entre autres :

- la **phagocytose** est un processus d'internalisation de grosses particules et de microorganismes (souvent supérieurs à $0,5\ \mu\text{m}$). Elle est dépendante de récepteurs, des microfilaments et indépendante de la clathrine. Les molécules qui sont phagocytées, sont soit reconnues directement par les récepteurs des cellules phagocytaires, soit requièrent l'opsonisation (le recouvrement par des protéines plasmatiques telles que certains composants du complément et des immunoglobulines) afin d'être reconnues par les récepteurs spécifiques des phagocytes.
- la **pinocytose adsorptive** est un système fonctionnant sans récepteur et l'entrée des complexes est médiée par interactions électrostatiques ou hydrophobes non spécifiques avec la membrane plasmique. Ce processus est indépendant de la clathrine (figure I.1c).
- la **pinocytose médiée par des récepteurs** (dépendante ou non de la clathrine). L'endocytose fonctionnant avec des puits tapissés de clathrine est la voie la plus connue d'entrée de complexes récepteur-ligand. Par exemple, l'internalisation de la transferrine et des LDL (Low Density Lipoprotein) se fait via ce processus (figure I.1a). L'endocytose médiée par des récepteurs mais indépendante de la clathrine existe aussi mais est peu fréquente (figure I.1c).
- la **macropinocytose** est induite transitoirement en réponse à des facteurs mitogéniques et implique la formation de grandes vésicules très hétérogènes appelées « macropinosomes » ($0,25$ à $5\ \mu\text{m}$). Ce mécanisme pourrait être responsable de l'entrée de certains complexes vecteur/ADN dans les cellules en division en culture (figure I.1b).

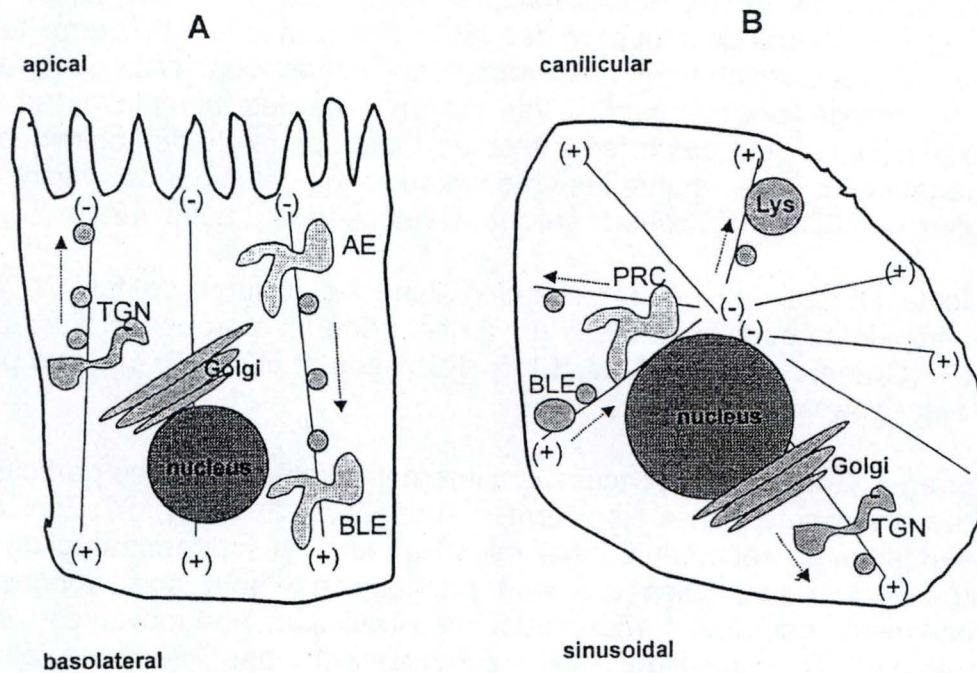


Figure 1.2 : Trafic polarisé dans une cellule épithéliale (A) et dans un hépatocyte (B) (Pouton et Colln, 1999).

- les **cavéoles** sont des invaginations de la membrane plasmique plus petites que les puits recouverts de clathrine. Elles sont caractérisées par la présence d'une protéine membranaire appelée VIP21 ou cavéoline (Kurzchalia et al, 1994). Ces structures existent dans de nombreux types cellulaires tels que les cellules des muscles lisses, les cellules endothéliales, les fibroblastes(Goldberg et al, 1987) et un rôle dans le processus de transport membranaire a été proposé (Schnitzer et al, 1994). Les cavéoles permettraient également de transférer des molécules directement dans le cytoplasme, en court-circuitant la voie endo-lysosomale, par un processus appelé potocytose (Anderson et al, 1992) (figure I.1d).

Les données de la littérature suggèrent que les complexes vecteur/ADN entreraient dans la cellule par certains de ces mécanismes. Zhou et Huang montrèrent en 1994 que des agents pharmacologiques connus pour interférer avec les voies endocytaires inhibent la transfection. Parallèlement, des études en microscopie électronique confirment ces résultats biochimiques : elles permettent de visualiser la localisation des complexes de poly-L-lysine (PLL) /ADN dans les vésicules de la voie endocytaire (Zhou et Huang, 1994). Cependant, certaines questions restent sans réponse. Par exemple, le diamètre observé de certains complexes vecteur/ADN est de loin supérieur au diamètre des vésicules recouvertes de clathrine (approximativement 100 nm). Donc l'entrée de ces complexes se passe obligatoirement par une autre voie, telle que la macropinocytose (Lamaze and Schmid, 1995).

Les complexes vecteur/ADN doivent ensuite outrepasser une autre barrière qui est le **relargage de l'endosome** pour éviter l'action hydrolytique des nucléases contenues dans les lysosomes.

Une fois dans le **cytoplasme**, les complexes requièrent aussi une protection contre les nucléases du cytosol et doivent encore être transportés jusqu'à la membrane nucléaire. Le cytoplasme est un fluide très visqueux dans lequel la diffusion des macromolécules et des particules est très lente (Luby-Phelps et al, 1987). Il est probablement nécessaire pour les complexes d'utiliser un système de transport actif dans le cytoplasme afin d'atteindre le noyau. Les vésicules, organelles et autres structures colloïdales sont transportées à l'aide d'un réseau de microtubules ou de microfilaments d'actines (Hamm-Alvarez, 1998).

Le déplacement de microtubules est médié par 2 protéines :

- Les kinésines se déplacent de manière centrifuge du pôle négatif vers le pôle positif de la cellule et jouent un rôle dans le cheminement des vésicules sécrétrices.
 - Les dynéines, quant à elles, se déplacent de manière centripète et sont associées aux voies d'endocytose.
- Ce trafic polarisé est illustré à la figure I.2.

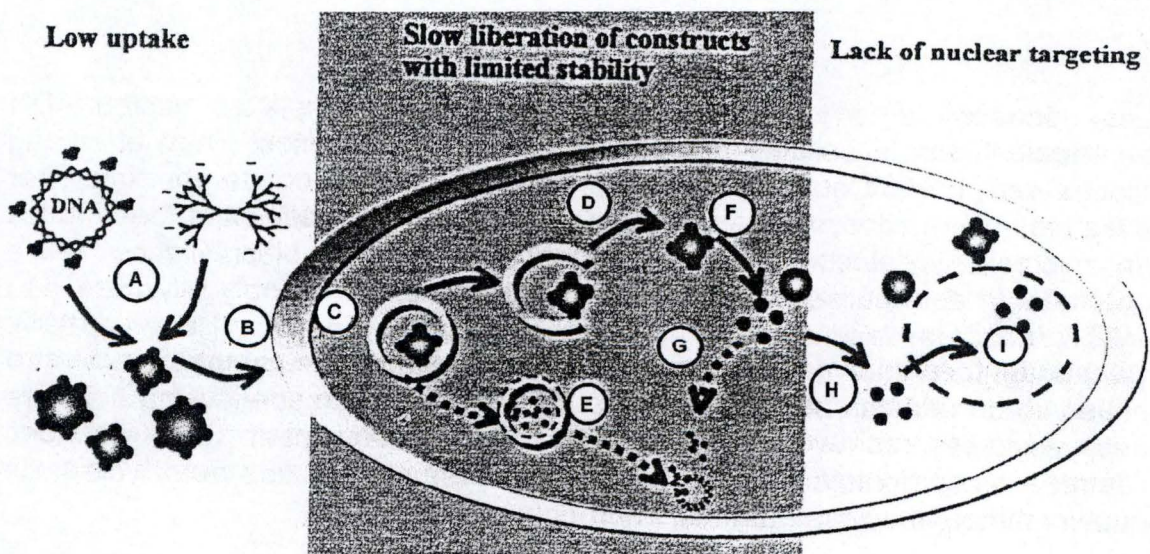


Figure 1.3 : Schéma illustrant les différentes barrières rencontrées par les complexes vecteur/ADN au sein d'une cellule : (A) formation du complexe (vecteur/ADN), (B) interaction avec la membrane plasmique, (C) endocytose, (D) relargage de l'endosome, (E) dégradation des complexes dans les lysosomes, (F) dissociation du complexe, (G) dégradation dans le cytosol, (H) ciblage vers le noyau, (I) entrée dans le noyau et expression du transgène (Luo et Saltzman, 1999).

Suite à ces connaissances, une première hypothèse a été émise. Les dynéines devraient conduire les complexes associés aux endosomes jusqu'au noyau. Néanmoins, si l'ADN s'échappe trop tôt de celui-ci, il ne pourra que difficilement atteindre le noyau.

Une deuxième hypothèse, concernant les mécanismes de transport, a été évoquée. Il est possible que les complexes profitent de la mitose pour entrer dans le noyau (Lechardeur et al, 1999).

Une question reste d'ailleurs toujours débattue : où se dissocient les complexes vecteur/ADN ? L'hypothèse la plus généralement admise est que cette dissociation se ferait dans le cytoplasme, avant l'entrée de l'ADN dans le noyau. Mais pour certains vecteurs, on n'exclue pas que la dissociation soit intra-nucléaire.

Enfin, la barrière rendant l'entrée des complexes dans le noyau difficile est la **membrane nucléaire**. Les complexes ou l'ADN entrent dans le noyau, soit par les pores nucléaires d'un diamètre très petit, soit lors de la mitose lorsque la membrane nucléaire se désintègre. Cela suppose des cellules en division, ce qui n'est pas toujours le cas.

En résumé, l'entrée peu aisée des complexes dans la cellule, le relargage difficile des complexes de l'endosome et la barrière majeure qu'est la membrane nucléaire constituent les trois obstacles principaux qui limitent l'efficacité de la transfection des cellules en culture (figure 1.3).

1.1.2.2 la thérapie génique « *in vivo* »

La thérapie génique consiste à transfecter des cellules *in vivo*. Nous nous situons à un degré de complexité supérieur car cela implique des barrières supplémentaires (en plus de surmonter les barrières intracellulaires comme c'est le cas de la transfection de cellules *in vitro*, il faut outrepasser les barrières extracellulaires).

Ces barrières dépendront bien sûr de la voie d'administration choisie. Nous nous limiterons ici à l'administration par voie intraveineuse, déjà pratiquée depuis plusieurs années chez des animaux, mais aussi chez l'homme.

En l'absence de surface hydrophile, beaucoup de particules interagissent avec les protéines spécifiques du plasma. Le recouvrement des particules se nomme « opsonisation ». Elle prépare une particule à être internalisée par un macrophage du système phagocytaire mononucléaire (MPS) provenant des tissus réticulo-endothéliaux. En pratique, 80 à 90 % des particules hydrophobes qui sont administrées par voie intraveineuse, sont opsonisées et sont éliminées par les macrophages du foie ou de la rate en quelques minutes.

Beaucoup de complexes vecteur/ADN activent également le système du complément visant également à éliminer les particules étrangères de l'organisme par des macrophages.

Table I.1 Critères d'un vecteur de transfection idéal en thérapie génique (*in vivo*)

Le système de délivrance doit :

- Etre peu coûteux.
- Etre facile à élaborer à grande échelle.
- Etre non toxique et non immunogène.
- Etre biodégradable.
- Protéger le plasmide contre la dégradation des nucléases.
- Etre stable dans la circulation et les tissus.
- Etre capable de cibler des cellules spécifiques.
- Etre capable de se libérer de l'endosome.
- Etre capable d'être relargué dans le cytoplasme et d'entrer dans le noyau
- Etre capable d'exprimer le transgène.
- Permettre une administration répétée.
- Pouvoir porter un ou plusieurs gènes de taille non restreinte.
- Etre capable d'exprimer le gène pendant une longue période.
- Etre capable d'introduire le transgène dans un grand nombre de cellules cibles.
- Non risqué au point de vue de la contamination par un virus.

(Malley et Couch, 1999)

Le ciblage sélectif vers un tissu ou un type cellulaire donné reste un problème majeur. La frontière hémato-encéphalique, qui comporte des jonctions serrées entre les cellules endothéliales, est la barrière la plus infranchissable rencontrée dans l'organisme. D'autres, tels que l'endothélium fenestré du rein, sont beaucoup plus perméables.

I.2 Les vecteurs de transfection

L'élaboration de vecteurs de transfection est un domaine en pleine expansion. La table I.1 reprend les critères auxquels un vecteur idéal devrait répondre. Le vecteur idéal est un vecteur biodégradable, facile à élaborer et à synthétiser à grande échelle. Son prix ne doit pas être excessif. Les vecteurs et les complexes vecteur/ADN non toxiques et non immunogènes sont particulièrement intéressants car ils permettent des applications répétées si cela s'avère nécessaire. Le transgène doit de préférence être exprimé pendant une longue période et être présent dans un grand nombre de cellules cibles. Le vecteur idéal devrait permettre également d'intégrer un ou plusieurs gènes sans aucune restriction de taille. Il ne peut en aucun cas, entraîner des risques de contamination par un virus pathogène. Enfin, pour être un bon vecteur, il faut pouvoir outrepasser les barrières intra et extracellulaires déjà mentionnées ci-dessus.

Les vecteurs utilisés jusqu'à présent peuvent être classés en deux catégories : les vecteurs viraux et les vecteurs non viraux. Nous allons les décrire rapidement et voir les avantages et les inconvénients de chacun. Mais avant tout, il faut également savoir qu'il est possible d'introduire de l'ADN nu dans les cellules par différentes méthodes.

I.2.1 L'ADN nu

Il y a plusieurs moyens pour introduire des plasmides dans des cellules. La méthode la plus classique consiste à réaliser une micro-injection d'ADN directement dans le noyau des cellules (Carpecchi, 1980). Cela conduit à l'expression du plasmide dans les cellules de l'hôte. Le nombre de cellules transfectées par microinjection est limité et la technique est principalement utilisée pour introduire des gènes dans des embryons afin de créer des animaux génétiquement modifiés (Carpecchi, 1989).

Une autre méthode est l'électroporation, qui est plus efficace mais limitée aux cellules en culture, même s'il existe des dispositifs expérimentaux permettant l'électroporation au niveau de la peau. Les cellules sont exposées à de l'ADN en présence de pulses électriques importants qui créent des pores transitoires dans la membrane de la cellule, permettant alors à l'ADN d'y entrer (Chu et al, 1987). Le principal avantage de cette technique est qu'elle est applicable à tout type de cellules en culture. Cependant, suite au choc électrique, 50 à 70 % de

Table 1.2 Les vecteurs viraux les plus couramment utilisés en thérapie génique

	Rétrovirus	Adénovirus	Virus-adéno associés
Taille maximale de l'insert	Intermédiaire ±10 kb	Intermédiaire ± 8 kb	Petit ±5 kb
Infection	Cellules en division	Large gamme	Large gamme
Intégration	Intégration au hasard dans le génome	Episome	Intégration au hasard dans le génome
Titre viral	bas	haut	bas
Risque	Mutagenèses insertionnelles	Réponse immune	Mutagenèses insertionnelles

(Malley et Couch, 1999)

cellules meurent. Le taux énorme de mortalité cellulaire reste donc un problème.

Une méthode plus récente, la plus prometteuse en application médicale comparée aux deux autres, est la biolistique (appelée aussi « gene gun »). Cette méthode consiste à bombarder les cellules, tissus ou organes avec des microparticules de métal (or ou tungstène) recouvertes d'ADN (Yang et al, 1990). Elle peut être utilisée pour des tissus facilement accessibles comme la peau ou le muscle.

Enfin, de manière très surprenante, l'injection d'ADN, directement dans le tissu musculaire entraîne une expression relativement importante et stable du transgène, même si le nombre de cellules transfectées reste faible (Wolff et al, 1990).

La microinjection, la biolistique et l'électroporation sont des techniques utilisées pour transférer de l'ADN nu mais peuvent aussi servir à transférer de l'ADN vectorisé.

1.2.2 Les vecteurs viraux

Il existe plusieurs vecteurs viraux dont les principaux utilisés pour transférer des cellules *in vivo* sont les rétrovirus, les adénovirus et les virus adéno-associés brièvement détaillés ci-dessous. La table 1.2 résume les caractéristiques principales de chacun d'eux.

1.2.2.1 Les rétrovirus

Les rétrovirus et les adénovirus constituent les vecteurs viraux les plus employés. Ils étaient utilisés dans environ 75% des essais cliniques en 1996 (Crystal, 1995).

Le principal avantage de ces vecteurs, dont la plupart dérivent du MoMuLV (Moloney murine leukemia virus) est l'intégration de l'ADN viral recombinant dans le génome de la cellule hôte, ce qui permet une expression prolongée du transgène. Mais cela veut dire aussi qu'ils requièrent des cellules en division pour l'intégration de l'ADN dans le génome de l'hôte et ce taux est peu élevé comparé à d'autres vecteurs viraux tels que les adénovirus (Wang et al, 1996). De plus, l'insert s'intègre au hasard dans le génome et peut donc causer des disruptions au niveau d'un gène ou des perturbations dans la régulation de l'expression d'un gène, ce qui pourrait favoriser un processus de cancérisation.

Le traitement de la maladie de Gaucher par thérapie génique est un exemple d'application exploitant les rétrovirus. Il s'agit d'une maladie causée par une enzyme déficiente : la glucocérébrosidase. L'expression de celle-ci peut être restaurée par transfection de complexes rétrovirus/gène codant pour la glucocérébrosidase dans des cellules souches hématopoïétiques de souris (déficientes pour cette enzyme) mises en culture. Ces cellules sont ensuite transplantées dans ces souris. On appelle cela, une application *ex vivo* car les

complexes vecteur/ADN ne sont pas introduits directement dans l'organisme. Un niveau élevé d'expression de la glucocérébrosidase a été détecté dans les cellules de toute la lignée hématopoïétique (Ohashi et al, 1992). Ce traitement est également applicable à l'homme où des cellules CD³⁴⁺ (cellules souches hématopoïétiques) sont isolées et infectées par le vecteur rétroviral exprimant le gène thérapeutique, puis réinjectées.

Transférer des cellules *in vivo* avec des rétrovirus est également réalisable à condition que les cellules soient en division comme par exemple les cellules tumorales. Le transgène intégré dans le rétrovirus peut être un gène suicide tel que la HSV tk (gène de la thymidine kinase du virus de l'herpès). La thymidine kinase convertit le ganciclovir, préalablement injecté dans la tumeur, en substance toxique, provoquant ainsi la mort des cellules. Cette technique est principalement employée pour certaines tumeurs du cerveau. Cette méthode comporte des limites car elle affecte relativement peu de cellules et utilise des vecteurs viraux qui constituent un risque au point de vue de la biosécurité (Culver et al, 1992).

Il est possible de transférer des cellules qui ne se divisent pas avec des rétrovirus de la famille des lentivirus comme par exemple le HIV, ce qui est intéressant pour un grand nombre d'applications *in vivo* (Bukrinsky et al, 1993 ; Galley et al, 1995). C'est le cas notamment de la mucoviscidose où les cellules de l'épithélium respiratoire se divisent peu.

1.2.2.2 Les adénovirus

Les adénovirus sont des vecteurs d'une efficacité remarquable pour transférer les gènes dans un large éventail de cellules *in vitro* et *in vivo*. Ils expriment aussi les transgènes à un niveau très élevé (Crystal, 1995 ; Horwitz, 1996).

Ces virus sont non enveloppés et possèdent un ADN double brin de 35,9 Kb. Ces virus peuvent encore tolérer un excédant d'ADN de plus ou moins 8 Kb pour les transgènes (Bergelson et al, 1997).

Contrairement aux rétrovirus, le transgène reste sous forme d'épisome et son expression n'est que transitoire (Rosenfeld et al, 1991). Pour une expression prolongée du transgène, il est donc nécessaire de répéter l'administration de virus, ce qui augmente les risques de réponse immunitaire.

Ces vecteurs ont été jusqu'à présent surtout utilisés pour les épithéliums respiratoires afin de traiter des maladies telle que la mucoviscidose. La mucoviscidose est provoquée par une mutation du gène CFTR (cystic fibrosis transmembrane regulator) qui code une protéine transmembranaire et celle-ci n'est plus exprimée en membrane ou n'est plus fonctionnelle. Il s'agit d'une protéine tunnel pour les ions chlorures. C'est également une ATPase de fonction encore inconnue. Mais quand elle est non fonctionnelle, les flux ioniques sont perturbés et le mucus, par exemple des voies respiratoires, devient très visqueux. En 1993, de l'ADNc du CFTR fut véhiculé par un vecteur adénoviral, pour la première fois administré à un patient souffrant de cette maladie.

I.2.2.3 Les virus adéno-associés (AAV)

Les virus adéno-associés (AAV) sont constitués d'un ADN simple brin et font partie des Parvoviridae. Ils possèdent de nombreux avantages comme la capacité de transfecter des cellules qui ne se divisent pas et ne provoquent pas de pathologie apparente connue (Blacklow, 1988). Ils ont aussi une faible immunogénicité et le taux d'expression du transgène est relativement élevé et stable.

Ils requièrent la co-infection par un virus helper : un adénovirus ou un virus de l'Herpès (Muzyczka, 1992 ; Buller et al, 1981 ; McPherson et al 1985). Le génome des AAV encode des protéines non structurales, les protéines *Rep* et des protéines de capside, les protéines *Cap*. Les protéines *Rep* (codées par le gène *rep*), régulent la réplication de l'ADN des virus, l'expression des gènes viraux et l'intégration ciblée de l'ADN viral au sein des chromosomes.

Néanmoins, le transgène ne peut dépasser 4,7 Kb et le gène *rep*, encodant les protéines *Rep* ayant la propriété d'intégrer le virus toujours au même endroit dans le génome de l'hôte, doit être excisé afin de laisser de la place au transgène. Il n'y aura donc pas d'intégration du virus au site spécifique et le risque de mutagenèse insertionnelle persiste toujours (Duan et al, 1999).

I.2.2.4 Les autres virus

Il existe d'autres vecteurs viraux tel que le virus de l'herpès qui peuvent intégrer jusqu'à 36 Kb pour le transgène. Cependant, le virus n'est pas complètement inactivé et peut être toxique pour les cellules. Le virus de l'herpès a la propriété d'infecter du tissu neuronal, ce qui est intéressant pour soigner les cancers du cerveau.

D'autres vecteurs viraux tels que le virus de papillome humain, le virus de la polio, les baculovirus et bien d'autres encore ont été utilisés mais aucun ne constitue un vecteur idéal, faisant l'unanimité.

I.2.3 Les vecteurs non viraux

Etant donné les limites liées à l'utilisation de vecteurs viraux, comme notamment le problème de la biosécurité et la limitation de taille du transgène, le développement de vecteurs non viraux a vu le jour. Il s'agit de molécules ou des complexes macromoléculaires, chargés positivement, qui vont pouvoir interagir avec les charges négatives de l'ADN. On parle alors de complexes polyélectrolytes se formant spontanément. Les complexes se présentent sous forme sphérique et leur taille, qui varie généralement entre 50 nm et 1 µm, dépend de nombreux facteurs, et notamment du rapport vecteur/ADN, de la concentration en sel ou de la température.

Quand le vecteur est de nature lipidique, les complexes vecteur/ADN sont appelés « lipoplexes ». On parle de « polyplexes » quand le vecteur est un polymère.

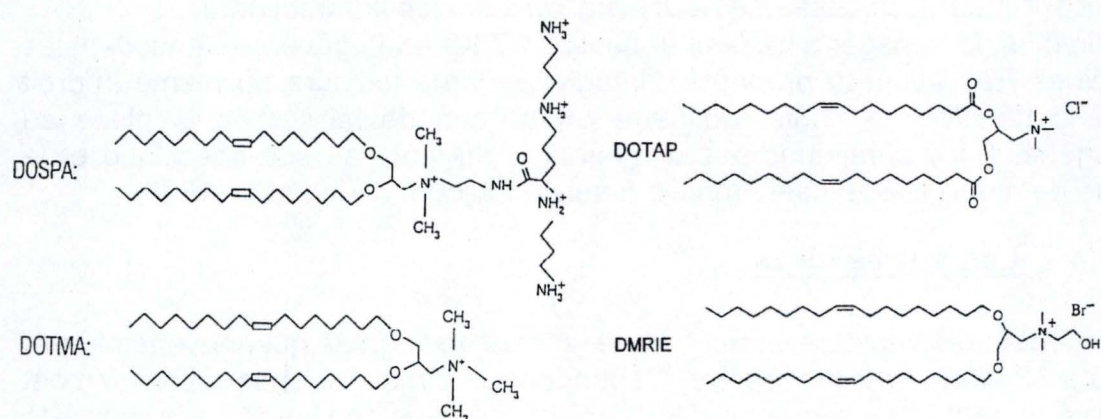


Figure 1.4 : Structure de différents lipides cationiques :

DOSPA : trifluoroacétate de 2,3-dioléoxy-N-[2(sperminecarboxamido)éthyl]-N, N-diméthyl-1-propanaminium

DOTMA : bromure de 2,3-dioléoxypropyl-1 tri-méthylammonium

DOTAP : chlorure de N-[1-(2,3-dioléoxy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium

DMRIE : bromure de 1,2-dimyristyloxypropyl-3-diméthyl-hydroxyéthylammonium
(Laurent, 2001 ; Mumper et al, 1999)

Voici les principaux vecteurs non viraux :

I.2.3.1 Le Phosphate de Ca^{2+} et DEAE-Dextran

La précipitation de l'ADN par le phosphate de calcium ou le DEAE-dextran (diéthylaminoéthyl-dextran) fut la première approche employée pour la transfection de cellules de mammifères en culture (Graham et Van der Eb, 1973 ; Danielsen et al, 1986). Néanmoins, ces complexes ont comme inconvénients d'être toxiques pour les cellules (Kawai et Nishizawa, 1984) et n'ont aucun succès *in vivo*. De plus, le DEAE-dextran ne peut être utilisé avec du sérum en culture, car celui-ci rend les complexes instables. Les complexes obtenus avec le phosphate de Ca^{2+} sont peu homogènes, ce qui provoque des variations de taux de transfection d'une manipulation à l'autre.

I.2.3.2 Les liposomes et lipides cationiques

Depuis le début des années 1970, les chercheurs n'ont cessé de développer des lipides cationiques. Dans un premier temps, les liposomes classiques étaient utilisés comme vecteurs de transfection. Ils étaient peu toxiques et pouvaient encapsuler des composés de masse moléculaire élevée. L'ADN était le plus souvent encapsulé dans des liposomes unilamellaires. Etant donné la faible efficacité de transfection de ces liposomes, Felgner et ses collaborateurs ont cherché à améliorer ces vecteurs. Ils développent en 1987 la Lipofectine, composée de DOTMA (bromure de 2,3-dioléoyloxypropyl-1 tri-méthylammonium) chargé positivement (figure 1.4) et de DOPE (dioléoyl phosphatidyléthanolamine) qui est un lipide neutre. Ils montrent que les lipides chargés positivement peuvent interagir avec l'ADN chargé négativement pour former des complexes lipides/ADN par interactions électrostatiques (Felgner et al, 1987).

Il existe de nombreux types de lipides cationiques et tous contiennent généralement 4 domaines fonctionnels :

- **Une « tête » hydrophile** munie d'une ou plusieurs charges positives portées par des fonctions amines et responsable de l'interaction avec l'ADN. Le nombre de charges influence la formation des complexes (Farhood et al, 1992), la protection de l'ADN de l'attaque des nucléases (Houk et al, 1999) et de ce fait influence la transfection.
- **Une partie intermédiaire** entre la tête hydrophile et la queue hydrophobe.
Ito et ses collaborateurs ont mis en évidence l'importance de la longueur de la partie intermédiaire en observant que les lipides cationiques contenant de longues parties intermédiaires (11 atomes) sont moins efficaces que ceux en possédant de plus courtes (2 à 6 atomes) (Ito et al, 1990 ; Remy et al, 1994).
- **Une liaison intermédiaire** faisant la jonction entre la partie hydrophobe et la partie hydrophile (sa nature chimique est aussi importante).

Les liaisons contenant des liens éthers ou C-N sont très stables, mais ne peuvent être dégradées enzymatiquement par la cellule. Elles induisent donc une certaine toxicité (exemple : DOTMA).

Le DOTAP (chlorure de N-[1-(2,3-dioléoyloxy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium) (figure 1.4), quant à lui, possède des liaisons constituées de liens esters, qui sont métabolisables par les cellules et dès lors, sont moins toxiques. Néanmoins, ces liens esters peuvent poser des problèmes en terme de stabilité.

- **Une partie hydrophobe** sous la forme d'une double chaîne d'acide gras (de 12 à 18 carbones) ou de dérivés de cholestérol.
Les queues hydrophobes assurent l'assemblage des lipides cationiques, en général en vésicules uni ou multilamellaires entourant l'ADN.
Le cholestérol faciliterait la sortie du polyplexe de l'endosome (Farhood et al, 1995) étant donné ses propriétés de fusion généralement meilleures par rapport aux chaînes d'acide gras, mais son mécanisme d'action n'est pas parfaitement connu (Leventis et Silviu, 1990). Le cholestérol tend également à stabiliser les lysosomes en milieu ionique.

Les lipides cationiques peuvent être utilisés seuls ou en combinaison avec des lipides neutres qui facilitent le relargage de l'endosome. Voici quelques exemples de produits commercialisés souvent utilisés pour la transfection de cellules en culture :

- Le **DOTAP** : chlorure de N-[1-(2,3-dioléoyloxy)propyl]-N,N,N-triméthylammonium (Roche)
- Le **DMRIE** : bromure de 1,2-dimyristyloxypropyl-3-diméthylhydroxyéthylammonium (Invitrogen)
- La **Lipofectine** : **DOTMA** (bromure de 2,3-dioléoyloxypropyl-1 triméthylammonium) + **DOPE** (dioléoyl phosphatidyléthanolamine) (Invitrogen)
- La **Lipofectamine** : **DOSPA** (trifluoroacétate de 2,3-dioléoyloxy-N-[2(sperminocarboxamido)éthyl]-N,N-diméthyl-1-propanaminium) + **DOPE** (Invitrogen)

La structure de ces lipides est illustrée à la figure 1.4

Bien que couramment utilisés *in vitro*, *in vivo* les lipides cationiques ont clairement des limites : ils sont rapidement éliminés du plasma s'ils sont administrés par voie intraveineuse, s'accumulent à l'intérieur des poumons (Ishiwata et al, 2000) et l'expression protéique est transitoire (pas plus d'une semaine) (Song et al, 1997). En outre, ils peuvent induire la production de cytokines et agir comme adjuvants (Mumper et al, 1999)

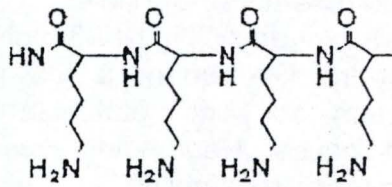
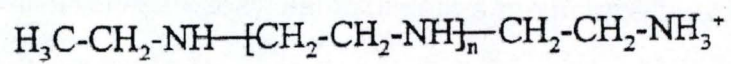
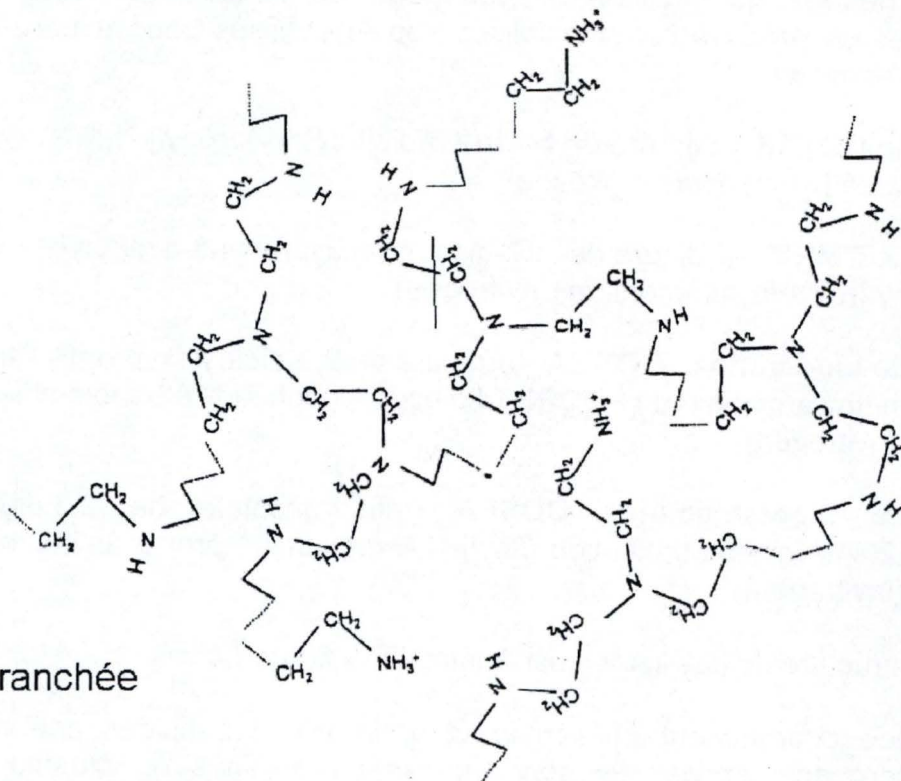


Figure I.5 : Structure de la Poly-L-lysine (PLL) (Laurent, 2001).



PEI linéaire



PEI branchée

Figure I.6 : Structure de la polyéthylèneimine (PEI) linéaire ou branchée (Godbey et al, 1999).

1.2.3.3 Les polymères

Tout comme les lipides cationiques, des polymères porteurs de groupements amines pouvant se protoner à pH physiologique, sont utilisés pour vectoriser de l'ADN. A nouveau, le complexe (appelé dans ce cas ci POLYPLEXE) est formé grâce aux interactions électrostatiques entre l'ADN et le polymère.

1.2.3.3.1 La poly-L-Lysine (PLL)

Le premier polymère synthétique à avoir été utilisé fut la poly-L-Lysine (PLL) (figure 1.5) couplée à un ligand, une asialoglycoprotéine pour le ciblage et la transfection d'hépatocytes (Wu et Wu, 1988). Contrairement aux liposomes, il est possible d'utiliser des ligands, comme le folate, des anticorps monoclonaux ... qui améliorent le ciblage vers les cellules spécifiques. La PLL seule condense aisément l'ADN et le protège efficacement de la dégradation, néanmoins le taux de transfection n'est guère plus important que celui de l'ADN nu. La PLL requiert donc un agent endosomolytique ou lysosomotropique comme la choroquine, afin d'améliorer son efficacité de transfection (Pouton et al, 1998). De plus, elle présente plusieurs inconvénients : les complexes PLL/ADN formés sont très hétérogènes en ce qui concerne leur taille et présentent une certaine toxicité, avec un caractère immunogène qui entraîne l'opsonisation des complexes (Dash et al, 1999).

Des systèmes hybrides lipides/poly-L-Lysine sont également de bons agents de transfection. Des études ont montré que des PLL couplées à des liposomes augmentent l'efficacité de transfection *in vitro* et *in vivo* par comparaison à l'utilisation de PLL ou de liposomes non combinés. Par exemple, Chen et ses collaborateurs ont réalisé une expérience *in vivo* en injectant des complexes liposomes/PLL/ADN dans une tumeur du sein après l'avoir implantée chez une souris nude. L'expression du gène rapporteur tel que la luciférase dans la tumeur, augmente de plus ou moins 15 fois, avec ce système hybride (Chen et al, 2000).

De même, des co-polymères de poly-(L-lysine-L-histidine) semblent être plus efficaces que la poly-L-Lysine seule (Midoux et Monsigny, 1999). Cela vient probablement du fait que, l'histidine augmente le pouvoir tampon dans l'endosome, ce qui facilite le relargage des complexes de celui-ci.

1.2.3.3.2 La polyéthylèneimine (PEI)

La polyéthylèneimine (PEI) existe sous forme linéaire (Ferrari et al, 1997 ; Chemin et al, 1998) ou sous forme branchée (Boussif et al, 1995 ; 1996) (figure 1.6). Elle est connue depuis plus de 50 ans et est utilisée comme composant dans plusieurs applications commerciales incluant des shampoings, des systèmes de purification d'eau et d'extraction minérale (Boussif et al, 1995).

La PEI est un polymère synthétique possédant plusieurs fonctions aminées. A pH physiologique, 17% des amines de la PEI sont protonées tandis qu'à pH 5, 45% des amines le sont (Suh et al, 1994). La PEI possède donc un pouvoir tampon considérable de par sa structure chimique particulière. Cette propriété

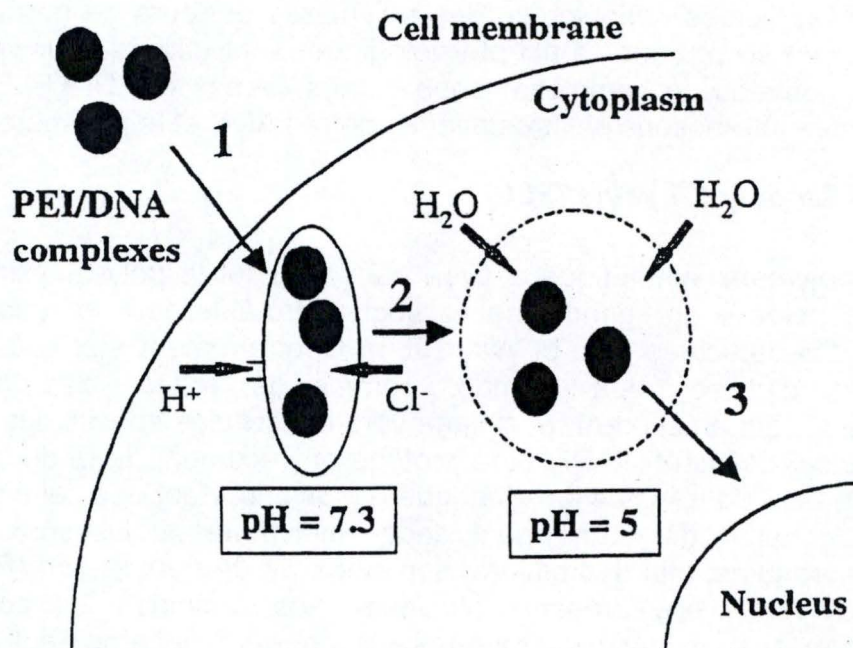


Figure I.7 : Phénomène d'éponge à protons : après l'endocytose du complexe PEI/ADN (1), l'entrée massive d'anions chlorure et de protons (2), mène à une augmentation de pression osmotique et finalement à la lyse de l'endosome(3) (Kichler et al, 2001).

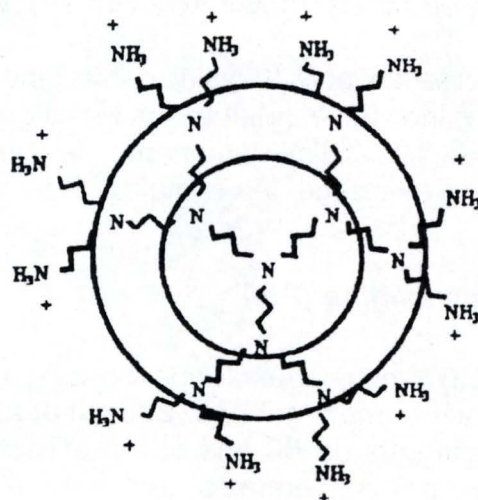


Figure I.8 : Structure d'un dendrimère polyamidoaminé (PANAM) (Mumper et al, 1999)

permet aux complexes de s'échapper de l'endosome avant de subir l'action hydrolytique des lysosomes. Ce polymère n'a donc pas besoin d'agents endosomolytiques pour transfecter efficacement les cellules, contrairement à la PLL (Klemm et al, 1998 ; Kichler et al, 2001).

L'hypothèse la plus répandue permettant d'expliquer les propriétés endosomolytiques intrinsèques de la PEI est celle de l'« éponge à protons » proposée par Behr et ses collaborateurs (Boussif et al, 1995). Les complexes et donc la PEI, entrent dans la cellule par endocytose et s'accumulent dans les endosomes où le pH est proche de 5. Vu le pouvoir tampon du PEI, les ATPases vésiculaires vont accumuler des protons. Mais l'intrusion d'un proton, est couplée à l'intrusion d'un ion Cl⁻. Cela provoque donc une augmentation importante de la concentration ionique dans l'endosome, suivie d'une entrée massive d'eau. Il en résulte la rupture de l'endosome et le relargage du complexe dans le cytosol (figure I.7). Néanmoins, il n'existe aucune preuve expérimentale claire validant définitivement ce modèle.

Signalons ensuite que la PEI est déjà efficace sans incorporation de ligand de ciblage, contrairement à la PLL. Cependant, il a été démontré que le greffage de transferrine sur la PEI améliorait la transfection de manière significative, sur des cellules possédant un grand nombre de récepteurs à la transferrine (cellules K562 : lignée leucémique erythromyéloïde). Mais la chloroquine n'améliore plus les performances de la PEI-transferrine, ce qui corrobore les propriétés endosomolytiques intrinsèques de la PEI (Kircheis, 1997).

Actuellement, la PEI semble le meilleur polymère de transfection *in vitro* et *in vivo*. Toutes les transfections réalisées avec les PEI linéaires sont plus efficaces que celles réalisées avec des liposomes cationiques par administration intraveineuse (Bragonizi et al, 1999) et intratrachéale (Ferrari et al, 1997). La PEI est cependant toxique lorsqu'elle est complexée à de l'ADN. Afin de diminuer cette toxicité, il est possible de lui greffer du polyéthylèneglycol (PEG). Cela permet également d'améliorer le ciblage des complexes vers le foie (Nguyen et al, 2000).

1.2.3.3.3 Les dendrimères polyamidoaminés (PAMAM)

Les PAMAM ont été découverts dans les années 80 (Tomalia et al, 1985 ; Dvornic et Tomalia, 1994) et ont une structure tridimensionnelle sphéroïdale hyperbranchée comportant des groupements amines primaires à l'extérieur et des amines tertiaires à l'intérieur (figure I.8). Leur structure est plus ordonnée que celle de la PEI. Grâce à leur synthèse chimique contrôlée, les dendrimères ont une forme et une taille précise. Une augmentation du nombre de groupements amines améliore l'efficacité de transfection (Toth et al, 1999). Les dendrimères ont également des propriétés endosomolytiques intrinsèques comme la PEI, mais moins prononcées que pour cette dernière.

Il existe deux sortes de dendrimères : d'une part, les dendrimères non activés et d'autre part les dendrimères activés par hydrolyse partielle. La différence entre les deux est que les dendrimères activés possèdent moins d'amines tertiaires, ce qui donne plus de flexibilité au dendrimère (figure I.9). Le

Dendrimer Structure

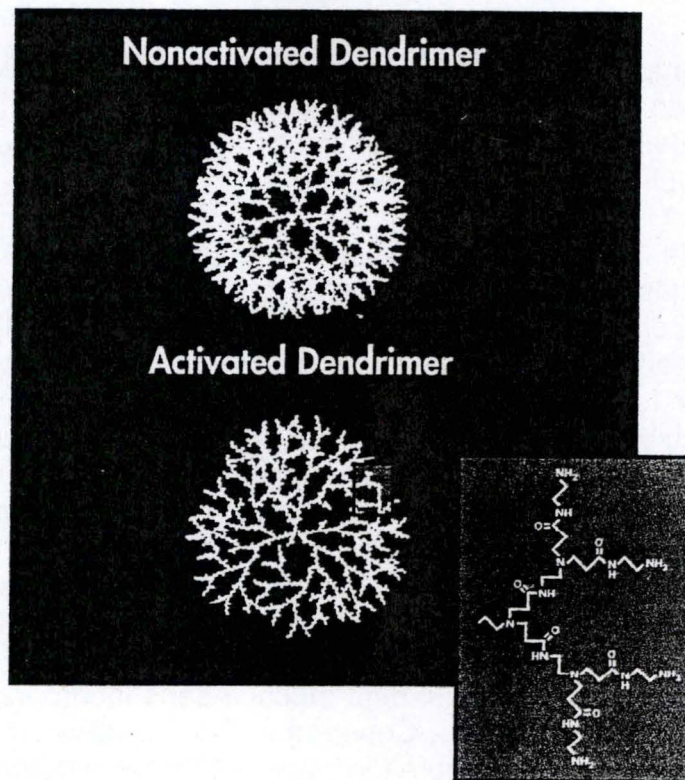


Figure I.9 : Schéma d'un dendrimère activé et non activé (QIAGEN Transfection Resource Book, 1999).

Activated-Dendrimer-DNA Interaction

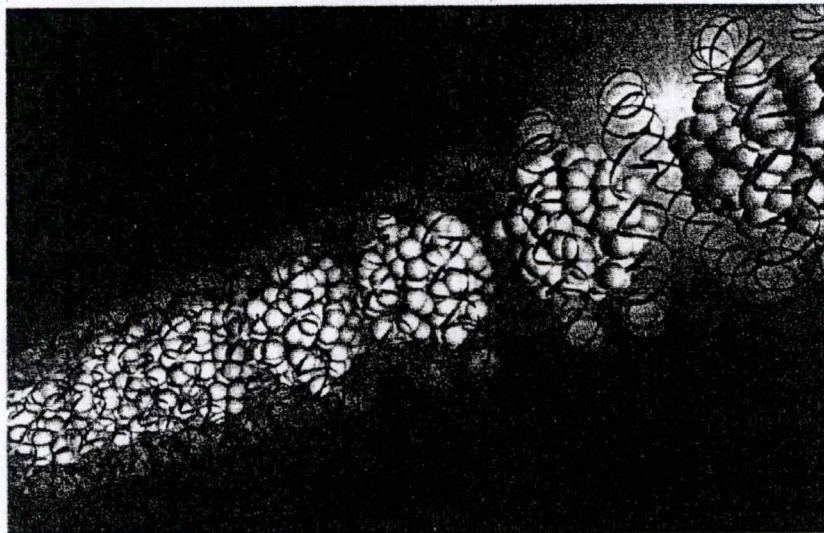


Figure I.10 : Schéma d'un dendrimère interagissant avec l'ADN. L'ADN s'enroulerait autour du SuperFect comme il le fait autour des histones (QIAGEN Transfection Resource Book, 1999).

SuperFect est un exemple de PAMAM activé fourni par la firme Qiagen. Selon cette firme, l'ADN s'enroule autour du SuperFect comme il le fait autour des histones (figure I.10).

1.2.3.3.4 Les polymères dérivés de dorsale méthacrylate

En 1996, Cherng et ses collaborateurs proposent l'utilisation de poly(MADAM) (méthacrylate de 2-diméthylamino)éthyl, comme polymère polycationique pour vectoriser l'ADN. Les avantages majeurs sont la facilité et le faible coût de synthèse, mais surtout les possibilités d'optimiser la structure, la composition, le poids moléculaire, la densité de charges, ... de manière contrôlée. En outre, les polyméthacrylates ont déjà fait leurs preuves, comme biomatériaux, bien tolérés par l'organisme, dans le domaine d'implants ophtalmologiques (Chirila, 2001) et osseux (Heini et Berlemann, 2001), ou de « drugs carriers » (Kopecek et al, 2000)

1.2.3.3.5 Le chitosan

Il existe également des vecteurs polymériques composés de sucres appelés chitosans.

Ce sont des polysaccharides linéaires composés de deux monosaccharides, la N-acétyl-D-glucosamine et la D-glucosamine, liés ensemble par un pont glycosidique β (1-4) (figure I.11). Ce sont des polymères naturels dérivés de chitine (poly-N-acétyl-D-glucosamine), qui est le constituant principal des coquilles et crustacés.

L'intérêt des chitosans est leur disponibilité commerciale en poids moléculaires variables (10 à 1000 KDa), avec un degré de déacétylation entre 70 et 90 %. En plus, les chitosans se sont avérés biodégradables et biocompatibles (Pangburn et al, 1982 ; Hirano et al, 1988).

Ils ont une structure similaire aux GAGs (glycosamino-glycanes) et minent leurs fonctions (Chandy et al, 1990). Les GAGs sont des composants des membranes et de la matrice extracellulaire, exprimés dans beaucoup de tissus. Les chitosans peuvent donc servir comme agents transfectants naturels, avec des propriétés intrinsèques de ciblage vers les surfaces des cellules (exemples : cellules endothéliales et épithéliales).

Les chitosans ne possèdent pas de charges permanentes mais ont des amines primaires qui peuvent se protoner ($pK_a=6,5$). Donc, à l'inverse de la poly-L-Lysine, ils ont une densité de charges faibles à pH physiologique, ce qui réduit considérablement leur toxicité (Chandy et al, 1990 ; Muzzarelli et al, 1994). De plus, les complexes ont la capacité de surmonter les trois obstacles majeurs de la transfection : l'entrée dans la cellule, le relargage de l'endosome, ainsi que l'entrée dans le noyau. Leur efficacité de transfection est donc assez importante. La facilité d'entrée des complexes chitosan/ADN dans les cellules a été observée au microscope confocal : les complexes FITC-chitosan/plasmide sont endocytés plus rapidement que les complexes Texas Red-dextran/plasmide (1 heure après la transfection) dans les mêmes cellules SOJ. La même équipe a également étudié le relargage de ces complexes de

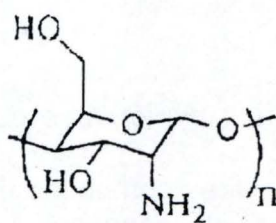


Figure I.11: Structure de l'unité de structure des chitosans (Laurent, 2001).

l'endosome et a montré que la quantité de protons transférés dans l'endosome était plus ou moins 2,5 fois supérieure si les cellules SOJ étaient transfectées avec les complexes chitosans/ADN plutôt qu'avec des complexes PLL/ADN. Le chitosan constitue donc aussi un système puissant de pompe à protons qui perturbe l'intégrité de la membrane de l'endosome. Enfin, la facilité de ces complexes à entrer dans le noyau a aussi été étudiée à l'aide du microscope confocal. Les complexes FITC-chitosan/ADN ont été détectés dans le noyau 4 heures après la transfection, ce qui n'est pas le cas des complexes FITC-PLL/ADN ou des complexes Lipofectines/ADN (Ishii et al, 2001).

La taille des particules chitosan/plasmide est largement influencée par le poids moléculaire du chitosan (Mumper et al, 1995 ; Mumper et Roleand, 1997). Un poids moléculaire inférieur à 90 KDa est un avantage, car cela permet de former des petits complexes. Récemment, Roy et ses collaborateurs ont observé que l'administration orale des préparations de monoparticules d'ADN complexé avec du chitosan provoque l'expression du transgène dans les cellules épithéliales de l'intestin *in vivo* (Roy et al, 1999). Dans ce cas, les complexes chitosan/ADN étaient encapsulés dans des microsphères d'alginate (Alexakis et al, 1995).

Mumper et ses collaborateurs ont également établi les paramètres critiques pour améliorer l'efficacité de transfection et se sont rendus compte que les sels et le sérum n'affectaient pas la stabilité des complexes, ce qui constitue un certain avantage (Mumper et al, 1995).

La stabilité colloïdale des complexes chitosan/plasmide en présence de sel et de sérum, en plus d'une administration orale possible et la capacité de surmonter les trois barrières majeures à la transfection font de ce système, un système attrayant de transfection cellulaire.

1.2.3.3.6 Les nanoparticules de poly [Acide Lactique-L-glycolique]

Jusqu'à présent, les vecteurs ne nous donnaient pas de possibilité de contrôler la quantité ni le temps d'administration de l'ADN dans l'organisme. Le PLGA (nanoparticule de poly Acide Lactique-L-glycolique) est une réponse à ce problème. L'ADN est encapsulé, grâce à une technique de double émulsion requérant la sonication, dans une microsphère de PLGA. L'addition de Ca^{2+} dans la phase d'émulsion permet une efficacité d'encapsulation de $\pm 70\%$, contre 28% en l'absence de Ca^{2+} . Cette technique ne compromet pas l'intégrité structurelle ni fonctionnelle de l'ADN. Cependant, le rapport entre la forme ouverte et superenroulée de l'ADN est modifié, probablement suite à la sonication. La forme superenroulée augmente considérablement, mais ceci constitue un avantage car cette forme est plus favorable à la transfection. Selon certains chercheurs, la forme superenroulée serait la forme la plus propice pour la transfection, puis la forme ouverte et enfin la forme linéaire (Weintraub, 1986).

La masse moléculaire du PLGA a un effet direct sur le pourcentage d'encapsulation de l'ADN ainsi que sur le relargage de celui-ci *in vitro* (Johnson, 1997). Une augmentation de masse moléculaire du polymère augmente le

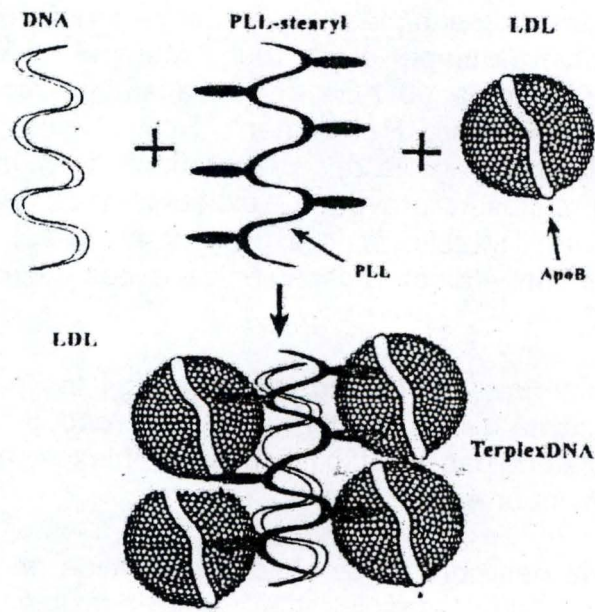


Figure I.12 : Schéma représentant la formation des Terplex. La PLL (polylysine) (groupements amines) se complexe avec l'ADN (phosphates) via des interactions électrostatiques. Quant aux groupements stéaryl greffés sur la PLL, ils participent aux interactions hydrophobes avec les LDL (Low Density Lipoprotein). Les LDL permettent le ciblage sur les cellules exprimant les récepteurs aux LDL (Yu et al, 2001).

pourcentage d'encapsulation de l'ADN et diminue le taux de relargage de l'ADN. La masse moléculaire du polymère est contrôlée par la présence ou l'absence de molécules hydrophiles telles que des peptides ou des protéines dans la phase d'émulsion. Ce vecteur est intéressant notamment pour la possibilité de contrôler les doses à administrer sur de longues périodes (presque un mois).

Il offre également d'autres avantages comme la stabilité élevée à température ambiante, il n'est pas toxique, est biodégradable et peut même être administré par voie orale.

I.2.3.4 Divers

La diversité dans la fabrication des vecteurs n'est donc limitée que par le degré d'imagination des chercheurs. Il est possible de combiner différents types de vecteurs comme la PLL couplée à un liposome (voir exemple précédent point I.2.3.3.1).

Un autre exemple est la combinaison d'un peptide fusogène tel que le peptide HA-2 (peptide fusogène porté par l'hémagglutinine HA-2 du virus de la grippe), de la Lipofectamine et de la PLL (voir exemple point I.3.3).

Les terplex sont des vecteurs composés de stéaryl-poly(L-Lysine), de LDL (Low Density Lipoprotein) et d'ADN (un plasmide ou un oligonucléotide antisens). Ils forment des complexes de plus ou moins 100 nm de diamètre. La PLL se condense avec l'ADN par interaction électrostatique (Kim et al, 1998) et le groupement stéaryl participe aux interactions hydrophobes avec les LDL (Yu et al, 2001) (figure I.12).

Des travaux montrent que l'incorporation de LDL aux polymères augmente considérablement le taux de transfection dans les cellules endothéliales (Sawamura et al, 1997), dans les myocytes (Hein et al, 1998) et dans les hépatocytes (Havel, 1998) car des récepteurs aux LDL sont présents sur ces cellules. Cela a pour effet d'augmenter l'endocytose médiée par des récepteurs.

Les terplex présentent de nombreux avantages comparé à l'utilisation d'ADN nu : ils sont stables en présence de sérum (Yu et al, 2001) et sont peu toxiques pour les cellules. De plus, ils sont non immunogènes et peuvent donc être administrés plusieurs fois dans l'organisme.

Néanmoins, ils sont complexes par leur structure et difficiles à produire à grande échelle. La purification des LDL est également relativement fastidieuse.

I.3 Comment surmonter les différentes barrières

Comme nous l'avons déjà mentionné plus haut, l'ADN doit surmonter différentes barrières avant d'arriver au site de transcription de la cellule cible.

L'ADN doit en effet :

- ✓ Echapper à l'opsonisation et l'activation du complément dans le compartiment sanguin
- ✓ Entrer dans la cellule
- ✓ Etre relargué dans le cytoplasme
- ✓ Etre transporté dans le cytoplasme
- ✓ Entrer dans le noyau

I.3.1 L'opsonisation et activation du complément

En l'absence de surface hydrophile, beaucoup de particules se font opsoniser par des protéines spécifiques du plasma. Il est possible de rendre les complexes plus hydrophiles en leur greffant du polyéthylèneglycol (PEG ou PEO) à leur surface. Cela évite alors l'opsonisation et augmente ainsi le temps de circulation des complexes dans le sang (Anwer et al, 2000). En effet, des complexes PEI/ADN et PEG/PEI/ADN ont été injectés par voie intraveineuse à des souris. Après 30 minutes, le sang a été collecté et la quantité d'ADN dans le sang a été déterminée par Southern blot. Plus ou moins 33% de l'ADN injecté, complexé à du PEG/PEI, était encore détectable, contre seulement 6 % pour l'ADN complexé au PEI (Ogris et al, 1999). Malheureusement, une addition de PEG peut diminuer l'entrée de l'ADN dans les cellules *in vitro* (Havie et al, 2000).

En 1996, Plank et ses collaborateurs ont étudié l'activation du complément en présence des différents complexes et ont constaté que les polymères tels que la PLL, les dendrimères et la PEI activent rapidement le complément à l'inverse des lipides cationiques. Néanmoins, des chaînes courtes d'oligolysines sont peu réactionnelles, comme les lipides cationiques (Plank et al, 1996).

I.3.2 L'internalisation dans la cellule

Lorsque l'on veut réaliser de la thérapie génique, la transfection doit se passer dans des cellules spécifiques. Néanmoins, il existe des interactions non spécifiques entre les complexes et les cellules. Les complexes polycation/ADN sont chargés positivement et la surface de toutes les cellules est chargée négativement suite à la présence de protéoglycanes et glycoprotéines. Il est dès lors difficile de cibler un certain type de cellules dans l'organisme.

Il existe toutefois des moyens de favoriser les interactions spécifiques ou de cibler certaines cellules :

- ***Soit en jouant sur la taille des complexes.***

Il est possible par cette méthode de cibler des régions spécifiques comme par exemple les tumeurs ou les territoires inflammatoires car les capillaires s'y révèlent plus perméables et permettent donc une extravasation passive des macromolécules circulantes à la condition que ces macromolécules restent stables assez longtemps dans la circulation. L'accumulation des complexes dans les tumeurs provient également d'un manque de drainage lymphatique dans celles-ci (Thorpe et Burrows, 1995 ; Jain, 1997).

- ***Soit en utilisant les mécanismes d'endocytose médiée par un système de récepteur/ligand.***

Il existe de nombreux ligands que l'on peut greffer de manière covalente ou non aux polycations. Ces ligands reconnaissent des récepteurs spécifiques, qui médient l'endocytose des complexes ligand-récepteur. Les ligands les plus fréquemment utilisés sont :

- la **transferrine** (voir par exemple Dautry-Varsat et al, 1983). Le récepteur à la transferrine est toutefois exprimé par différents types cellulaires et n'offre donc pas la possibilité d'un ciblage spécifique. La transferrine est souvent couplée à de la PLL. Dans la plupart des cas, l'efficacité d'entrée de complexes transferrine/PLL/ADN est corrélée avec le niveau d'expression des récepteurs à la transferrine (Kircheis, 1997). Les cellules tumorales expriment souvent un taux élevé de récepteurs et peuvent en posséder jusqu'à 150 000 par cellule, ce qui peut donc être exploité en thérapie génique anticancéreuse.
- les **asialoglycoprotéines** : elles reconnaissent des récepteurs (ASGPR-asialoglycoprotein receptor) sur les hépatocytes et favorisent de ce fait le ciblage des complexes *in vitro* et *in vivo* sur ces cellules. Le ciblage vers les hépatocytes de plasmides complexés à la PLL modifiée par couplage covalent à une asialoglycoprotéine, s'avère être une stratégie de transfection *in vivo* parmi les plus efficaces pour les vecteurs non viraux (Wu et Wu, 1998).
- les **LDL** (voir par exemple Goldstein et al, 1985) qui se lient aux récepteurs à l'Apo-B100 (protéine associée aux LDL). Ces récepteurs sont abondants au niveau du foie, mais également exprimés dans de nombreux tissus périphériques. En outre, les LDL sont fastidieuses à préparer et difficiles à manipuler et à conserver.
- Les **facteurs de croissance** tels que l'EGF (Epithelial Growth Factor) (Cristiano et al, 1996) et les bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) (Sosnowski et al, 1996) qui peuvent favoriser le ciblage vers des cellules spécifiques, via les récepteurs correspondants.

- Outre les ligands reconnus par un récepteurs spécifique, on peut également greffer aux vecteurs, des **anticorps spécifiques** d'un type cellulaire ou d'un tissu. Les anticorps reconnaissant les récepteurs CD3 des lymphocytes T, ont permis des transfections *in vivo* avec un certain succès (Dash et al, 1999).

1.3.3 Le relargage de l'endosome

L'importance du relargage de l'endosome a été comprise très tôt par Wagner et ses collaborateurs (Plank et al, 1992), ce qui a amené plusieurs chercheurs à explorer les mécanismes viraux d'échappement endosomal.

L'**hémagglutinine** (HA) du virus de la grippe est une protéine trimérique, qui a deux fonctions dans l'infection par les adénovirus. Elle est responsable de la liaison entre le virus et la surface de la cellule cible et induit la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de l'endosome, grâce à un peptide fusogène permettant ainsi le relargage du virus dans le cytoplasme de la cellule (Steinhauer et al, 1995).

Il est bien établi que c'est la partie N-terminale de la sous unité HA-2 qui joue ce rôle crucial dans la fusion des membranes (Rafalski et al, 1991). A pH neutre, le peptide n'interagit pas ou peu avec la membrane de l'endosome. Arrivée dans l'endosome, cette protéine virale a la capacité de changer de conformation à pH acide. Elle adopte une conformation en hélice α amphipathique, ce qui permet l'insertion du peptide fusogène dans la membrane de l'endosome et permet ainsi le relargage de l'ADN dans le cytosol.

Plank et ses collaborateurs ont montré qu'un peptide de 23 acides aminés, correspondant à cette partie N-terminale de la sous-unité HA-2 (peptide INF7), était capable de reproduire les effets de l'hémagglutinine entière. Le peptide INF7 a été incorporé dans des complexes PLL/ADN afin d'augmenter l'efficacité de la transfection (Plank et al, 1994). Le taux de transfection est augmenté d'un facteur 100 dans les cellules de mélanome humain en culture (Mechtler et Wagner, 1997).

Un autre exemple est la combinaison d'un peptide fusogène tel que HA-2, de la lipofectamine et de la PLL-molossine. La molossine est un peptide provenant du venin d'une vipère d'Amérique (*Crotalus molossus molossus*). La PLL-molossine combinée au peptide fusogène et la lipofectamine ont été testés en transfection séparément. L'efficacité de transfection est nettement améliorée quand les 3 agents sont combinés. 60 à 65% des cellules Hep G2 (cellules d'hépatocarcinome humain) sont transfectées si on utilise la combinaison des 3 agents. Ce taux de transfection n'excède pas 20% s'ils sont testés séparément (Zhang et al, 2001).

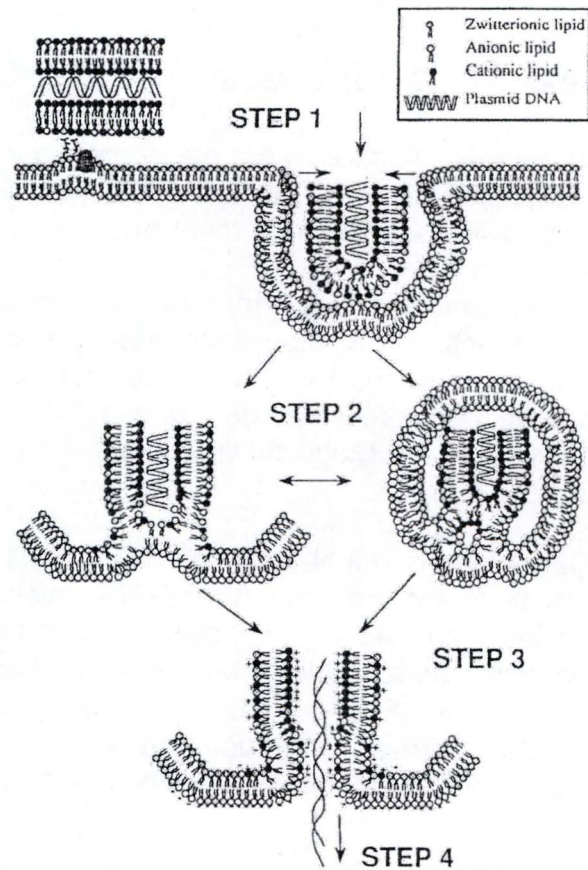


Figure I.13 : Modèle proposé par Xu et Szoka en 1996 représentant l'entrée des lipoplexes dans la cellule et le relargage de l'ADN dans le cytoplasme. Après l'interaction électrostatique entre les lipoplexes et la membrane plasmique, le lipoplexe est internalisé (step1). La déstabilisation de la membrane de l'endosome résulte du flip-flop avec des lipides anioniques (step2) et est suivie par la diffusion de lipides anioniques (step3). Enfin l'ADN se dissocie du complexe et entre dans le cytoplasme (step4) (Pouton et Colin, 1999).

A côté des peptides fusogènes, il existe également des agents dits endosomolytiques et lysosomolytiques qui favoriseraient également le relargage des complexes vecteur/ADN de l'endosome.

La **choroquine**, par exemple, a la propriété d'éviter la dégradation de l'ADN par les nucléases acides. C'est une base faible qui est capable de diffuser dans un environnement acide tel que celui des vésicules endo-lysosomales des cellules eucaryotes. Son mécanisme d'action n'est pas totalement élucidé. La choroquine bloquerait le transport des macromolécules des endosomes vers les lysosomes en perturbant les mécanismes d'acidification des endosomes. Cela permettrait ainsi à l'ADN d'échapper à la dégradation par les nucléases acides (Luthman et Magnusson, 1983). Une autre hypothèse propose que la rupture de l'endosome serait provoquée par une accumulation massive de molécules de chloroquines chargées positivement à pH acide (Erbacher et al, 1996).

Certains polymères cationiques, tels que la PLL, nécessitent un peptide fusogène comme le peptide INF7 ou une base faible lysosomotrope (comme la choroquine) pour transfecter efficacement. A l'inverse, d'autres vecteurs tels que la PEI, les dendrimères et les lipides neutres possèdent des propriétés intrinsèques permettant le relargage de l'endosome (Cf. 1.2.3.3.2 mécanisme d'éponge à protons).

Dans le cas particulier des lipoplexes, la nature même des lipides peut jouer un rôle dans le relargage des complexes à partir de l'endosome. Voici le modèle proposé en 1996 par Xu et Szoka (figure 1.13). Ce modèle comporte plusieurs étapes :

- 1) Interactions électrostatiques entre les lipoplexes cationiques et la membrane plasmique suivie de l'internalisation des lipoplexes.
- 2) La membrane de l'endosome se déstabilise, résultant du phénomène de flip-flop des lipides anioniques.
- 3) Les lipides anioniques diffusent dans le complexe.
- 4) Enfin, les lipides de l'endosome et du complexe fusionnent, l'ADN se dissocie du complexe et entre dans le cytoplasme de la cellule.

Cependant, aucune preuve expérimentale n'a pu confirmer cette hypothèse.

1.3.4 Le transport dans le cytoplasme

Après l'entrée du complexe dans la cellule et le relargage de celui-ci dans le cytosol, il doit être transporté jusqu'à la membrane nucléaire. Il sera probablement nécessaire pour les complexes d'utiliser les systèmes de transport actif dans le cytosol de la cellule avant d'atteindre le noyau (voir point précédant 1.1.2.1).

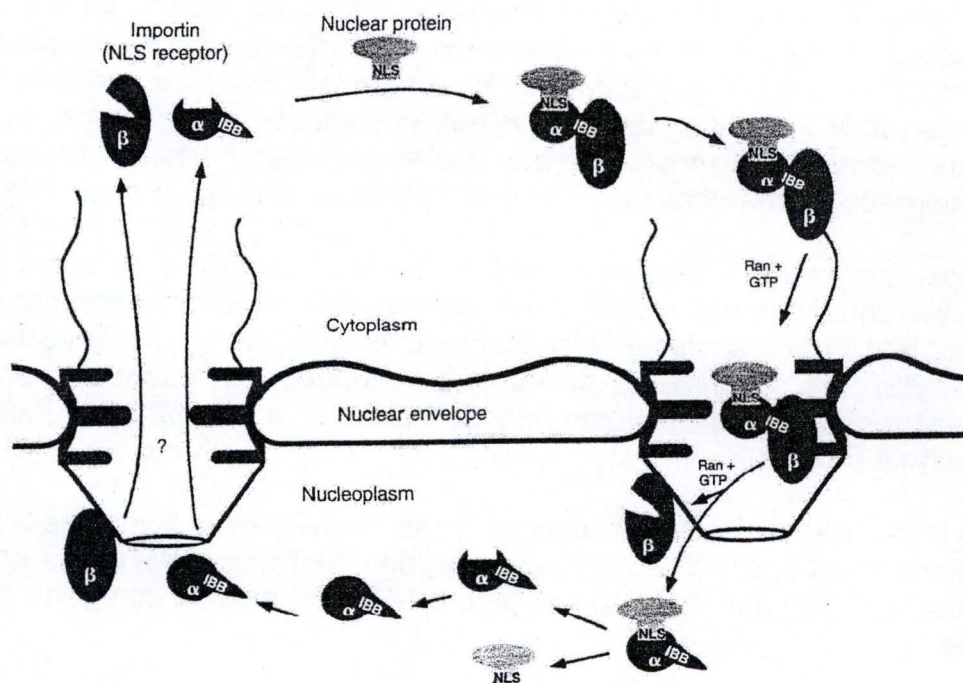


Figure I.14 : Schéma illustrant le transport de protéines par les pores nucléaires. Les protéines contenant un NLS se lient aux importines α , qui elles-mêmes sont liées aux importines β . Ces dernières interagissent avec des composants du pore nucléaire et l'hétérodimère est transloqué à travers le pore nucléaire. La translocation est un processus actif impliquant l'hydrolyse du GTP. La protéine contenant le NLS, les importines α et les importines β sont transloquées dans le nucléoplasme. Le complexe se dissocie, et les importines sont probablement recyclées dans le cytoplasme (Gorlich et Mattaj, 1996).

Le cytoplasme est aussi un environnement hostile, à cause de la présence de nucléases. Les polycations protégeraient l'ADN contre ces nucléases (Lechardeur et al, 1999).

Avant l'entrée dans le noyau, il nous reste un point essentiel à aborder. L'ADN doit-il être ou non libéré du complexe pour pouvoir être transcrit par la machinerie de transcription dans le noyau ?

Pollard et ses collaborateurs ont répondu en partie à cette question (Pollard et al, 1998). En procédant par des méthodes d'injection d'ADN nu ou complexé à l'intérieur du cytoplasme ou du noyau de cellules eucaryotes, il conclut que l'ADN doit être séparé des lipoplexes cationiques avant d'atteindre le noyau. Mais les observations diffèrent pour les lipoplexes et les polymères, tels que la PEI et la PLL qui peuvent accompagner le transgène jusque dans le noyau. En effet, pour ces derniers, ces auteurs ont montré que les complexes entiers pouvaient être microinjectés dans le noyau, sans affecter l'efficacité de transfection. La dissociation polymère/ADN pourrait donc également s'effectuer dans le noyau.

I.3.5 L'entrée dans le noyau

Il est clair que la difficulté d'accès au noyau à cause de la présence de la membrane nucléaire, constitue une barrière majeure pour les systèmes non viraux de délivrance d'ADN (Zabner et al, 1995 ; Wilke et al, 1996).

Pour que l'ADN exogène passe du cytoplasme dans le noyau, il y a deux voies majeures : soit il passe via les complexes des pores nucléaires et on essaie d'améliorer ce processus, soit il passe quand la membrane nucléaire est dissociée, c'est à dire au cours de la mitose.

Nous commencerons par les pores nucléaires. Des échanges libres de petites particules du cytoplasme jusqu'au noyau peuvent s'effectuer par les NPC (Nuclear Pore Complex) qui sont des canaux estimés à 9 nm de diamètre. Les particules inférieures à 40 KDa peuvent diffuser librement, mais le processus est lent.

Des études réalisées avec des virus, tels que le virus SV 40 (virus simien 40) ou le virus de la grippe, suggèrent que ceux-ci possèdent un système de transport leur permettant d'entrer dans le noyau (Whittaker et al, 1996 ; Greber et Kasamatsu, 1996).

Il existe des mécanismes de transport actif à travers ces NPC qui permettent aux protéines endogènes inférieures à 60 nm (histones, facteurs de transcription,...) d'entrer dans le noyau plus rapidement. Ces protéines endogènes ou nucléoprotéines possèdent un motif nommé NLS (Nuclear Localisation Signal). Ce motif interagit avec des importines du cytoplasme et utilise de l'énergie lors du passage dans le NPC en hydrolysant du GTP (Guanosine Tri-Phosphate) (figure I.14).

Beaucoup de protéines virales contiennent des NLS qui assurent l'entrée dans le noyau par un mécanisme de transport actif (Whittaker et al, 1996).

Les NLS n'ont pas de séquence consensus stricte mais possèdent généralement un groupe de résidus cationiques entourés de prolines. La séquence NLS la plus connue est -PKKKRKV- (K=lysine, R=arginine, P=proline, V=valine) qui est la séquence de localisation nucléaire de l'Antigène T du virus SV 40. Néanmoins, d'autres chercheurs affirment que ce motif n'est pas suffisant pour une entrée rapide dans le noyau (Dworetzky et al, 1988 ; Yoneda et al, 1992). De plus, la plupart des NLS se composent de deux parties séparées par 10 à 12 résidus. La séquence consensus minimale des NLS en deux parties est K/R-K/R-(10-12 acides aminés)-K/R-K/R-K/R. Par exemple BP1 est une protéine de la polymérase du virus de la grippe. Sa séquence nucléaire est composée de deux domaines basiques séparés par 16 acides aminés (Nath, 1990).

Plusieurs auteurs ont donc essayé d'insérer un ou des NLS dans l'ADN. D'un point de vue chimique, l'opération n'est pas simple et les résultats obtenus diffèrent considérablement selon les équipes (pour une revue récente, voir Cartier et Reszka, 2002). C'est probablement l'équipe de Zanta et ces collaborateurs (pour une revue voir Kamiya et al, 2001) qui ont observé l'amélioration la plus significative (de 10 à 150 fois) de la transfection. Le NLS est conjugué à un oligonucléotide via un agent « crosslinker » bifonctionnel. L'oligonucléotide est en épingle à cheveux et après greffage des NLS, est attaché par ligation à un ADN double brin. Mais cet effet positif de NLS incorporé dans l'ADN n'a été démontré de manière irréfutable que pour de l'ADN linéaire. La question reste toujours ouverte pour de l'ADN plasmidique (pour une revue plus détaillée, voir Cartier et Reszka, 2002).

L'autre voie d'entrée dans le noyau exploite la division cellulaire : dans les cellules eucaryotes, la membrane nucléaire se dissocie au cours de la mitose et plusieurs recherches ont souligné l'importance de ce phénomène. Par exemple, un traitement à l'aphidicoline bloque la division cellulaire et donc la membrane nucléaire reste toujours intacte. Le traitement diminue le taux de transfection (Morimer et al, 1999 ; Escriou et al, 2001).

D'autre part, Brunner et ses collaborateurs ont observé un taux élevé de transfection lorsque les complexes sont ajoutés en phase S (synthèse) ou G2 (gap 2) du cycle cellulaire, c'est-à-dire juste avant la mitose. Cependant, s'ils ajoutent les complexes en phase G1, le taux de transfection est nettement plus faible. Cela confirme l'importance de la mitose dans le processus de transfection (Brunner et al, 2000).

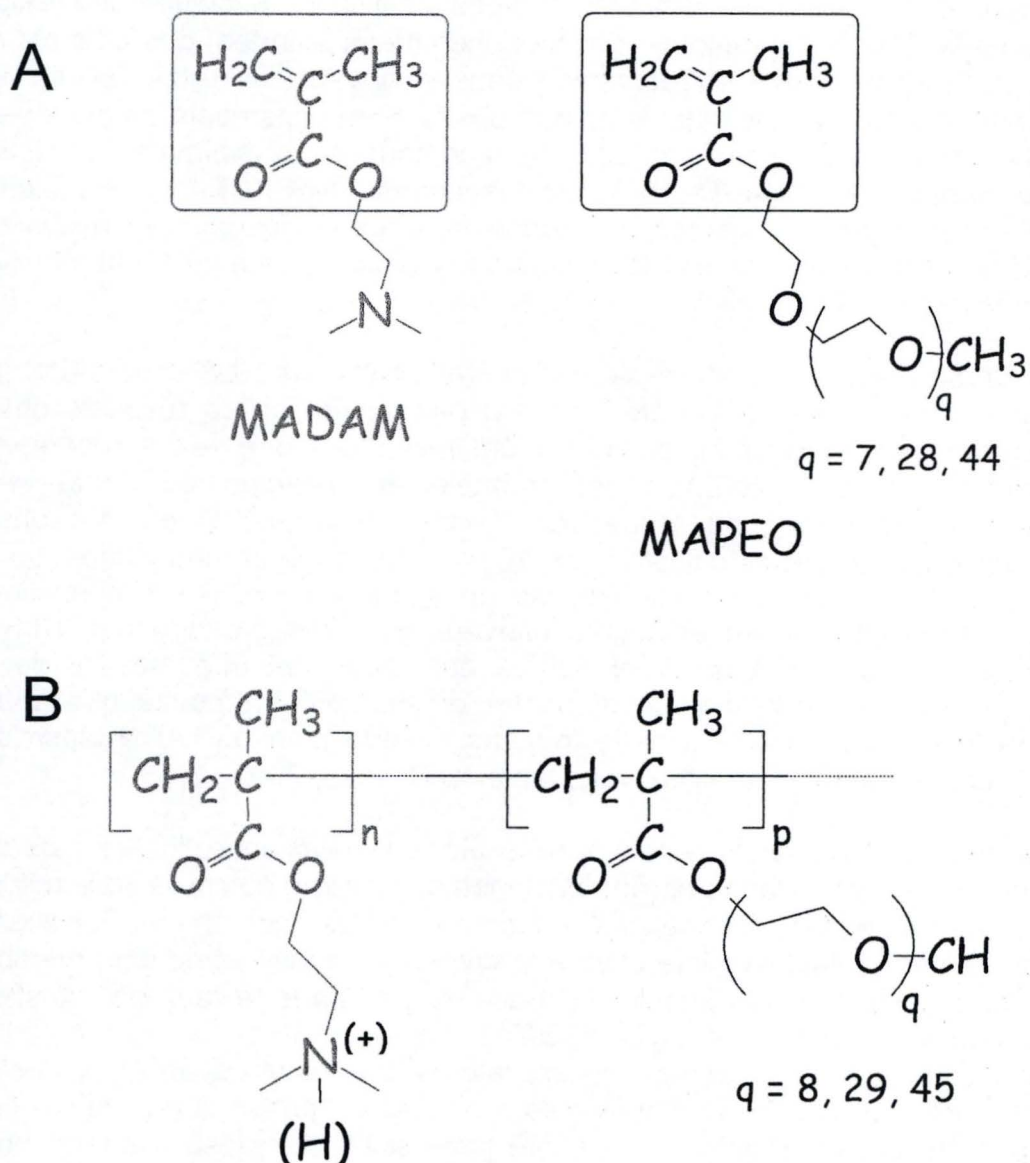


Figure 1.15 : (A) Structure des monomères utilisés, (B) des co-polymère de MADAM. L'amine peut se protoner à PH physiologique et se charger positivement.

I.4 Le projet polyplex

La vectorisation d'ADN exogène reste donc une problématique importante, qui se heurte toujours à de nombreux obstacles, qu'il s'agisse des vecteurs synthétiques, ou des vecteurs viraux.

Si l'on reprend la table I.1, présentant les caractéristiques attendues d'un vecteur idéal, il est clair que les vecteurs synthétiques restent compétitifs, ce qui justifie d'ailleurs les efforts des nombreuses équipes qui s'y consacrent :

- coûts de production limités ;
- facilités de production à grande échelle ;
- toxicité et immunogénicité acceptables ;
- biodégradabilité (en tous les cas pour certains d'entre eux) ;
- complexation possible à des ADN de taille très variable ;
- pas de risque de biosécurité.

Enfin, les progrès récents dans la synthèse macromoléculaire, permettent de construire de manière plus rationnelle des homo ou co-polymères cationiques, avec un certain contrôle sur la composition, la longueur des chaînes et les possibilités de greffage de motifs peptidiques (peptides de ciblage, peptides de type NLS, peptides fusogènes,...).

Ce travail s'inscrit dans le cadre général d'un programme de recherche financé par la Région Wallonne et a pour but la mise au point de nouveaux polycations synthétiques non-toxiques et hémocompatibles destinés à la vectorisation d'ADN dans les cellules de la paroi vasculaire. Les cellules endothéliales sont des cellules cibles potentielles dans le cadre de la thérapie génique visant à traiter par exemple les maladies cardiovasculaires telle que l'athérosclérose, pour induire une néo-angiogenèse dans des tissus ou organes ischémiés.

Afin de surmonter les différentes barrières décrites ci-dessus, il est clair que le vecteur synthétique idéal doit être un matériau polymère fondamentalement complexe permettant d'additionner et d'exprimer toutes les propriétés désirées. Cependant, les vecteurs décrits jusqu'à présent sont des homopolymères ou des co-polymères polycationiques de structures moléculaires peu contrôlées : poly-L-Lysine, polyéthylèneimine,... et ils forment des agrégats de grande taille limitant leur diffusion à travers les barrières biologiques.

Le vecteur proposé est un polymère de poly(MADAM) (méthacrylate de 2-(diméthylamino)éthyl)) (figure I.15) composé d'une dorsale de méthacrylate sur laquelle seront greffés différentes fonctions permettant de répondre aux différentes contraintes décrites précédemment :

- Un (ou des motifs) **PEO** (polyoxyde d'éthylène) (ou PEG) (figure I.15) greffés sur le poly(MADAM) : le PEO devrait permettre d'éviter l'opsonisation des complexes et réduire la toxicité des complexes vis à vis des cellules. Des motifs PEO peuvent être greffés à différents endroits sur la dorsale de méthacrylate : dans le prolongement de la dorsale, polymérisés latéralement de façon aléatoire ou latéralement en bloc (figure I.16). La longueur de chaîne est également un paramètre que l'on peut modifier de manière contrôlée.

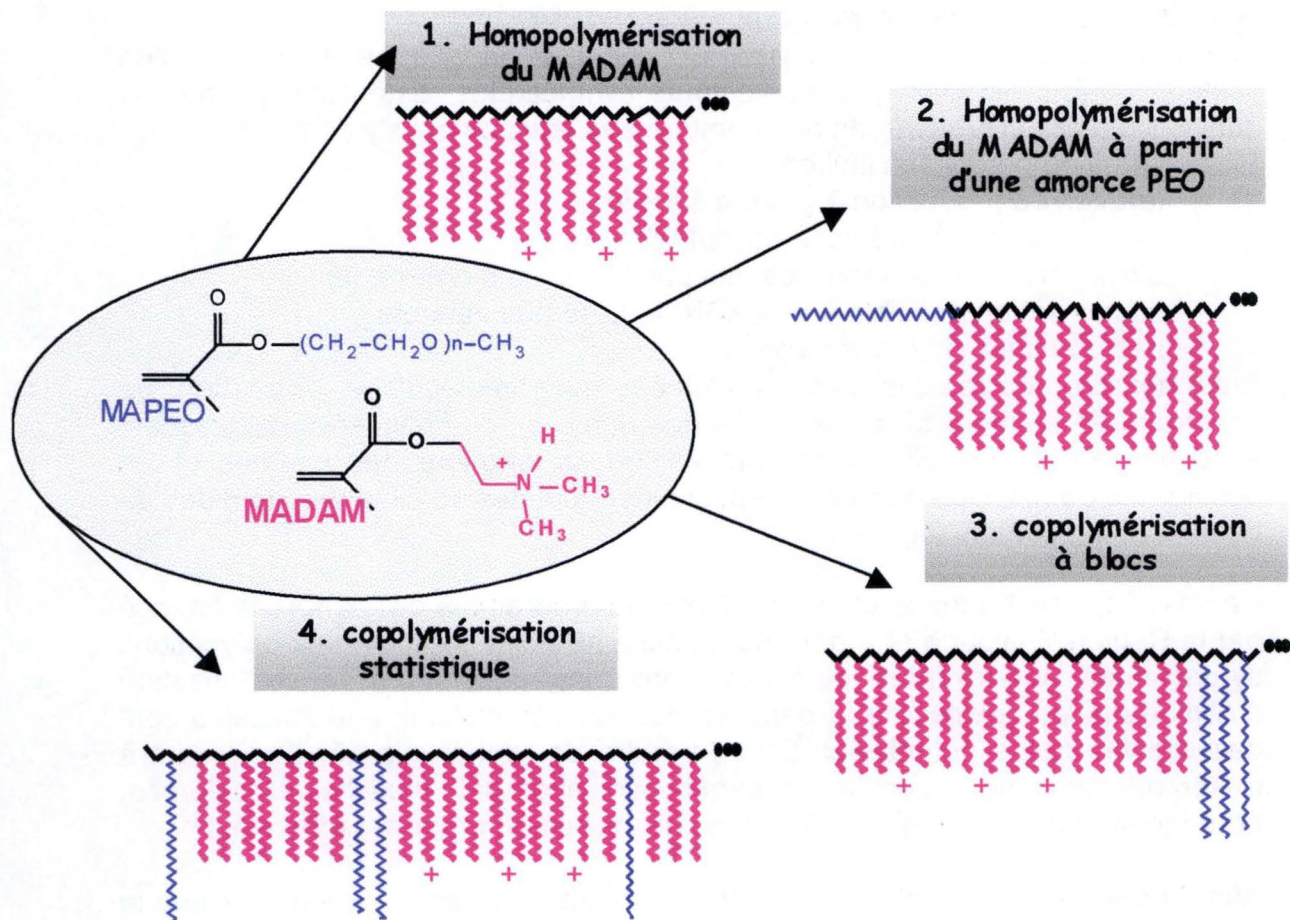


Figure I.16: Structures des 4 types de Poly(MADAM) synthétisés à Mons (UMH).
 1: les homopolymères de MADAM constitués de plusieurs éléments de MADAM chargés positivement. Ce sont les polymères de base.
 2 type : les homopolymères de MADAM synthétisés à partir d'une amorce PEO.
 Des copolymères sont également synthétisés :
 3 : Des copolymères constitués de chaînes de MAPEO et de chaînes de MADAM en bloc. On parle de « copolymérisation en bloc »
 4 : Des copolymères où les chaînes de MAPEO sont incorporées aléatoirement entre les chaînes de MADAM. On parle alors de « copolymères statistiques ».

- Des **peptides de ciblage** vers les cellules endothéliales pourront être attachés sur les chaînes de poly(MADAM).
- Des **peptides fusogènes**, permettant le relargage de l'endosome, si les charges positives du poly(MADAM) ne suffisent pas.

Ce type de polymères a déjà été utilisé par l'équipe de van de Wetering et ses collaborateurs (van de Wetering et al, 1998 ; 1999). Plusieurs poly(MADAM) ayant un PM supérieur ou égal à 60 ont déjà été utilisés comme vecteurs de transfection et forment des complexes de 0,2 à 1 μm . Les transfections étaient réalisées sur des cellules Cos-7 utilisant le plasmide Lac Z, codant pour le gène de la β -galactosidase, comme gène rapporteur. Le taux de transfection optimale, qui est de 3 à 6 % a été atteint avec les polymères de 360 KDa (formant des complexes de 0,2 μm) dans les rapports polymères/ADN se situant entre 3/1 et 5/1.

Mais lorsque des polymères sont synthétisés par voie classique de synthèse, toute la population de polymères n'a pas le même poids moléculaire et la population obtenue est donc hétérogène. Dans ce projet les polymères sont synthétisés de façon plus contrôlée permettant d'obtenir une population de poids moléculaire plus homogène par synthèse. Ceci est possible grâce à une méthode de polymérisation non conventionnelle utilisant des catalyseurs (métal de transition : Cu^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{3+} ,...) et des ligands (amine). Cette nouvelle technique est appelée ATRP « Atom Transfert Radical Polymerization ».

L'optimisation de ces vecteurs synthétiques suppose un effort multidisciplinaire. Le projet Polyplex réunit trois laboratoires en réseau : le Service des Matériaux Polymères et Composites (SMPC) de l'Université Mons-Hainaut (UMH), le Laboratoire de Biochimie et de Physiologie Générale de l'Université de Liège (ULg) et l'Unité de Recherche en Biologie Cellulaire (URBC) des Facultés Notre-Dame de la Paix (FUNDP).

UMH : Le Service des Matériaux Polymères et Composites se charge de synthétiser les vecteurs de poly(MADAM) par la méthode ATRP.

FUNDP : Le Laboratoire de Biologie Cellulaire étudie l'efficacité des différents complexes à transfecter les cellules. Au stade actuel du projet, ce sont les cellules Cos-7 qui sont utilisées dans les premières mises au point et screening. Mais à moyen terme des cellules endothéliales seront également testées. Cela nous permet de comparer l'efficacité de transfection des différents vecteurs nouvellement synthétisés afin de sélectionner et d'améliorer les plus prometteurs.

Nous caractérisons également le cheminement intracellulaire de ces nouveaux polymères dans les cellules Cos-7 en culture, depuis la membrane jusqu'au noyau. Ces renseignements nous permettront de mieux cerner les polymères les plus prometteurs et éventuellement d'orienter les synthèses de nouveaux polymères vers une forme plus efficace en transfection.

ULg : Le Laboratoire de Biochimie et de Physiologie Générale s'occupe de la caractérisation physico-chimique et de l'évaluation de la biocompatibilité des complexes vecteur/ADN.

Avant que ne commence ce mémoire, l'équipe avait déjà choisi les cellules sur lesquelles ils allaient réaliser les transfections. Il s'agit donc des cellules Cos-7, car elles sont réputées pour être des cellules plus facilement transfectables que les cellules endothéliales. Le plasmide rapporteur choisi est le pCMV β et l'agent transfectant de référence, le SuperFect (Qiagen). Un certain nombre de paramètres de transfection avait déjà été mis au point pour cet agent, tels que le nombre de cellules par puits, le rapport polymère/ADN, le temps d'incubation avec les complexes, ...et quelques poly(MADAM) synthétisés à Mons avaient déjà été testés en transfection. Parmi ces polymères, certains étaient capables de transfecter les cellules Cos-7, mais moins efficacement que le SuperFect.

I.5 Le but du mémoire

Le mémoire se divise en deux parties :

La première partie, plus appliquée, s'intègre dans les tests de screenings et d'évaluation que prend en charge l'URBC, pour les différents polymères synthétisés à l'UMH. L'optimisation des polymères peut se faire à deux niveaux :

Premièrement, un travail de recherche des conditions optimales de transfection pour les poly(MADAM) sera effectué. Chaque polymère est d'office testé pour plusieurs rapports polymère/ADN, mais en plus, il faut également tenir compte d'autres paramètres comme :

- le tampon de complexation ;
- la qualité de l'ADN pCMV β : présence ou non d'endotoxines, forme ouverte ou superenroulé, ... ;
- le mode de préparation des complexes.

Deuxièmement, des poly(MADAM) avec des amorces PEO (figure I.16b) seront également testés en transfection sur les cellules Cos-7 afin de voir si :

- ces co-polymères transfectent toujours les cellules Cos-7, car l'ajout d'une amorce PEO pourrait gêner la transfection des cellules ;
- l'amorce de PEO diminue bien la toxicité des complexes vis-à-vis des cellules par rapport aux complexes poly(MADAM)/ADN sans PEO ;
- l'amorce de PEO joue son rôle de protection, empêchant l'interaction des protéines du sérum avec les complexes, en comparant les co-polymères avec les complexes poly(MADAM)/ADN sans PEO.

La deuxième partie de ce travail, est plus fondamentale et s'intéresse au cheminement intracellulaire des polyplexes. En suivant l'ADN exogène, au cours du temps après la transfection, par microscopie confocale, nous espérons préciser le cheminement intracellulaire des polyplexes testés et peut-être mettre le doigt sur l'étape limitante, car jusqu'à présent, les polymères testés se sont toujours avérés moins efficaces que le SuperFect, dendrimère commercial, utilisé comme référence.

II MATERIELS ET METHODES

II.1 Culture cellulaire

Au cours de ce mémoire, nous avons utilisé des cellules Cos-7. Elles sont issues de reins de singes et ont été choisies car elles sont réputées pour être facilement transfectables. Les polymères sont donc testés sur ces cellules afin de se rendre compte de leur efficacité de transfection.

II.1.1 Matériel et solutions :

- Boîtes de culture de 75 cm² de surface (T75) (Costar, Réf : 3375)
- PBS : phosphate buffer saline ; phosphate 10 mM pH 7,4 ; NaCl 0,9%.
- Bleu de trypan (Sigma, Réf T8154).
- Trypsine (0,5 µg/ml) – EDTA (0,2 µg/ml)
(acide éthylènedinitrotétraacétique) (Gibco, Réf 25 300-054).
- *Milieu de base composé de :*
 - DMEM : Dulbecco's Modified Eagles Medium. (Gibco, Réf : 31 885-023).
 - Pénicilline (100 U/ml), Streptomycine (100 µg/ml) (Bio-Whittaker, Réf : DE17602E).
 - Fungizone 250 ng/ml (Gibco, Réf : 15290-026).
 - HEPES : 20 mM acide N-[2-Hydroxyéthyl]pipérazine-N'-[2-éthanesulfonique] (Acros, Réf : 172572500).
- *Milieu complet composé de :*
 - Milieu de base + 10% FBS : Sérum de veau foetal (Gibco, Réf : 10 270-106).

II.1.2 Méthode :

- Lorsque les cellules arrivent à confluence, il convient de les repiquer dans des boîtes de culture T75. Afin d'éviter toute contamination, il est nécessaire de travailler sous hotte à flux laminaire.
- Après avoir ôté le milieu, les cellules sont rincées deux fois avec 10 ml de PBS stérile.
- 1 ml de trypsine/EDTA est déposé sur les cellules pendant 1 à 2 minutes afin de les détacher.
- 10 ml de milieu complet sont ajoutés à la suspension cellulaire, pour arrêter l'effet de la trypsine, et sont transvasés dans un tube stérile de 10 ml (Sterilin).
- Cette suspension cellulaire est centrifugée 10 minutes à 1000 rpm.

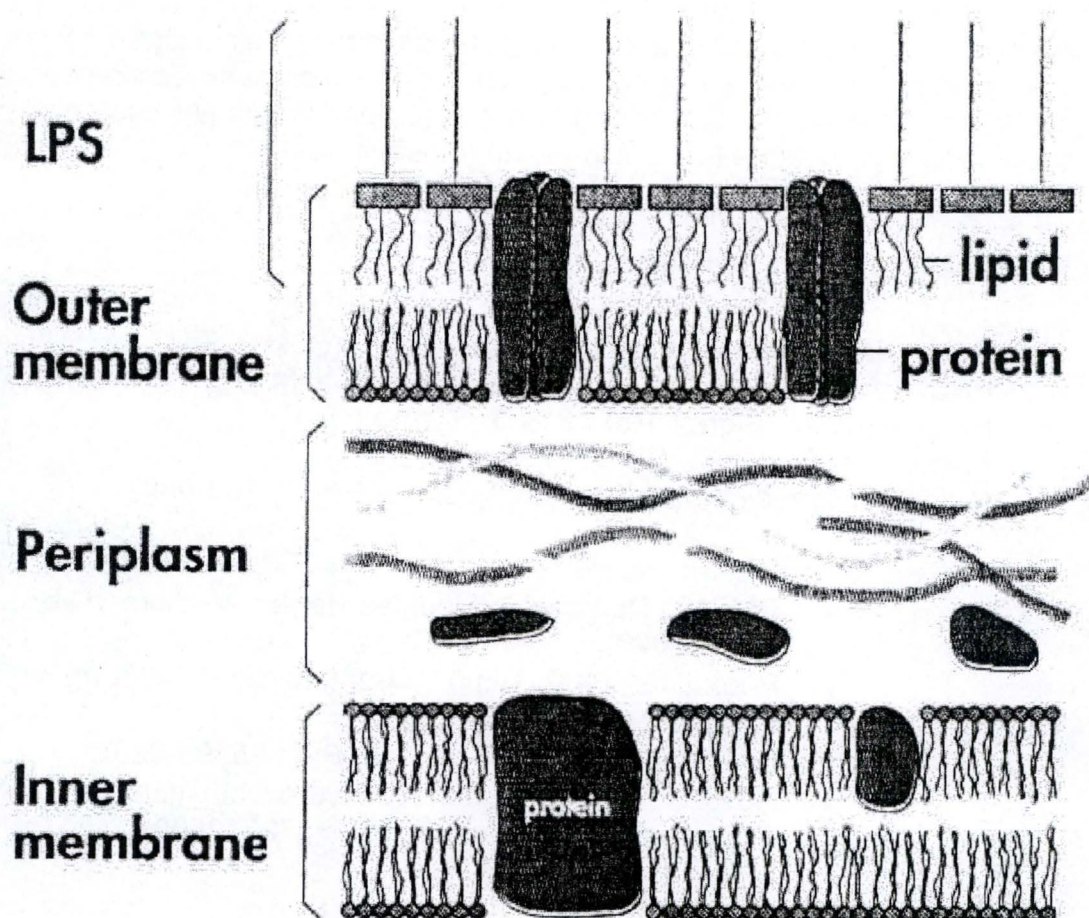


Figure II.1 : Schéma de l'enveloppe de *E. coli* (bactérie Gram négative). L'enveloppe est constituée de trois couches : la membrane interne, le périplasme et la membrane externe contenant les LPS (lipopolysaccharides). Les LPS sont également connus sous le nom d' « endotoxines » (Qiagen Production Guide 2000)

- Le surnageant est enlevé et le culot contenant les cellules est resuspendu dans 10 ml de milieu complet.
- La densité cellulaire de la suspension est déterminée par un comptage des cellules au moyen d'une chambre de Neubauer : 100 μ l de la suspension cellulaire obtenue après centrifugation sont prélevés et dilués 2 fois avec du bleu de trypan. Celui-ci permet de différencier les cellules mortes colorées des cellules vivantes incolores.
- Les cellules sont ensemencées à une densité voulue (entre $1 \cdot 10^6$ et $2 \cdot 10^6$ cellules/T75) dans 20 ml de milieu complet et incubées sous atmosphère humide à 37°C et 5% CO₂.

II.2 Préparation d'ADN pCMV β

Les transfections sont réalisées avec des complexes polymères/plasmides pCMV β . Nous avons donc été amené à préparer une grande quantité de plasmide.

Pour ce faire nous avons dans un premier temps introduit le plasmide dans une souche bactérienne *E. coli* par transformation. Après amplification de la culture bactérienne et lyse de ces cellules, l'ADN est purifié par chromatographie sur colonne échangeuse d'ions (Maxi préparation).

Les bactéries *E. coli* peuvent libérer des endotoxines (lipopolysaccharides contenues dans la membrane externe des bactéries Gram négatives) (figure II.1) qui sont entraînées avec l'ADN au cours de la purification. Ces endotoxines peuvent influencer le taux de transfection.

La firme Qiagen propose 2 kits de préparation de l'ADN :

- Le premier ne tient absolument pas compte de la présence ou non d'endotoxines dans les échantillons.
- Le second comprend une étape supplémentaire permettant d'éliminer ces endotoxines.

De l'ADN pCMV β a été préparé par ces 2 méthodes. Nous les appellerons respectivement pCMV β « normal » et pCMV β « endofree ».

II.2.1 Transformation bactérienne

II.2.1.1 Matériel

- Milieu LB (Lennox Broth) : base servant à la maintenance et à la propagation d'*E. coli* (Difco, Réf : 240 230).
 - Une solution de 2% de LB en poudre est préparée dans de l'eau désionisée.
 - Le milieu est autoclavé 20 minutes à 121°C avant utilisation.
 - Le milieu terminé est composé de :
 - Hydrolysate de caséine (peptone) 1%
 - NaCl 0,5%
 - Extrait de levure 0,5%
 - Si un milieu LB+ampicilline est souhaité, de l'ampicilline est ajoutée à la préparation de LB, pour avoir une concentration finale de 100 µg/ml (Sigma, Réf : A-9518)).
- Boîtes de Pétri LB + agar (qui permet au milieu de culture de se solidifier) (DIFCO, réf : 214010).
 - Une solution de 2% de LB en poudre et 1,5 g d'agar est préparée dans de l'eau désionisée.
 - Le milieu est autoclavé 20 minutes à 121°C avant utilisation.
 - Lorsque la température est descendue à 55°C, de l'ampicilline est ajoutée dans le milieu pour avoir une concentration finale de 100 µg/ml.
 - La solution est ensuite versée dans les boîtes de Pétri (± 20 ml).
 - Lorsque le milieu est solidifié, les boîtes sont séchées en conditions stériles.
- Plasmide pCMVβ (Clontech, Réf : 6177-1)
- Souche de bactéries : *E. coli* Sure (Stratagene)
Génotype : e14⁻(McrA⁻) Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)171endA1 gyr A96 relA1 lac recB recJ sbc C umu C : Tn 5 (Kan^r)uvrC
- Solution de CaCl₂ à autoclaver :
 - 60 mM CaCl₂ (Merck, Réf : 2382)
 - 15% glycérol (Merck, Réf : 4094)
 - 15 mM PIPES (acide pipérazine-N,N'-bis (2-éthanesulfonique)) pH 7 (Sigma, Réf : 6757)

II.2.1.2 Méthode

II.2.1.2.1 Préparation des bactéries CaCl_2 compétentes

- Une préculture de bactéries est réalisée par inoculation d'une colonie d'*E. coli* Sure dans 50 ml de milieu LB + ampicilline. Les bactéries se développent durant environ 12 heures à 37°C sous agitation.
- Après ce délai, 2 ml de cette préculture sont inoculés dans 250 ml de LB + ampicilline. Cette culture se développe à 37°C sous agitation jusqu'à ce que la densité optique à 590 nm atteigne 0,6-0,7 (phase de croissance exponentielle).
- 2 fois 100 ml de cette culture sont prélevés dans 2 cylindres stériles, puis incubés 10 minutes sur glace.
- Le tout est centrifugé 7 minutes à 3000 rpm à 4°C.
- Les culots sont resuspendus dans 20 ml d'une solution de 60 mM de CaCl_2 à 4°C et centrifugés pendant 5 minutes à 2500 rpm à 4°C.
- Les culots sont de nouveau resuspendus dans 20 ml de CaCl_2 stérile à 4°C et sont ensuite incubés 30 minutes sur glace.
- La suspension est centrifugée 5 minutes à 2500 rpm à 4°C. Les culots sont alors resuspendus dans 4 ml de solution de CaCl_2 froide avant d'être aliquoté par 100 μl (conservation à -70°C).

II.2.1.2.2 Transformation bactérienne

- Le plasmide (50 ng/10 μl) est ajouté à 100 μl de bactéries dans un tube eppendorf et le tout est incubé 10 min dans la glace.
- Ce tube eppendorf est transféré sur un bloc chauffant préchauffé à 42°C pendant 2 minutes. Ces bactéries auront donc subi un choc thermique important qui permettra l'entrée du plasmide dans celles-ci.
- 300 μl de LB avec ampicilline préchauffés à 37°C sont ajoutés aux bactéries qui sont incubées 30 minutes à 37°C (dans le but de laisser les bactéries récupérer) avant d'être étalées sur les boîtes de Pétri au moyen d'un râteau.
- Les boîtes sont laissées entre-ouvertes à proximité d'une flamme pour faciliter le séchage et sont disposées à l'envers dans une étuve sèche à 37°C toute la nuit.

II.2.2 Maxi préparation d'ADN plasmidique

II.2.2.1 Matériel

- Utilisation des kits :

- Qiagen plasmide maxi préparation kit Réf : 12162
- EndoFree Plasmid kit Réf : 12362

Ces deux kits comprennent :

- Tampon P1 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 ; 10 mM EDTA (acide éthylènedinitrilotétraacétique), 100 µg/ml RNase A
- Tampon P2 200 mM NaOH , 1% SDS (dodécyl sulfate de sodium)
- Tampon P3 3,0 M Acétate de Potassium, pH 5,5
- Tampon QBT 750 mM NaCl ; 50 mM MOPS (acide 3-[N-morpholino] propanesulfonique), pH 7.0 ; 15% Isopropanol, 0,15 % Triton
- Tampon QC 1,0 M NaCl ; 50 mM MOPS, pH 7.0 ; 15% Isopropanol
- Tampon QN 1,7 M NaCl ; 50 mM MOPS, pH 7.0 ; 15% Isopropanol
- Tampon TE 10 mM Tris, pH 8.0 ; 1 mM EDTA
- colonne QIAGEN-tip 500

Le kit EndoFree comporte en plus :

- Tampon ER composition confidentielle mais il sert à éliminer les endotoxines
 - colonnes Qiafilter Maxi
- Ethanol (Merck, Réf : 0983) concentration finale : 70% (dilué dans de l'H₂O).
- Isopropanol (Merck, Réf : 9634).

II.2.2.2 Méthode

II.2.2.2.1 Culture des bactéries

- Le lendemain de la transformation, des colonies isolées sont prélevées des boîtes de Pétri et transférées dans des tubes Sterilin de 10 ml contenant 2 ml de LB + ampicilline.
- Ces tubes sont placés pour la nuit dans un incubateur à 37°C sous agitation constante (250 rpm).
- Le lendemain, les 2 ml de culture sont utilisés pour inoculer 200 ml de milieu frais (LB + ampicilline).
- Les erlenmeyers, contenant les bactéries, sont placés dans l'incubateur à 37°C, pour la nuit sous agitation constante (250 rpm).

II.2.2.2.2 Purification d'ADN (selon les spécifications du kit)

- Le lendemain, les 200 ml de culture sont centrifugés à 6000 rpm pendant 4 min à 4°C.
- Le surnageant est éliminé et les bactéries (culot) sont resuspendues dans 10 ml de Tampon P1.
- 10 ml de Tampon P2 y sont ajoutés et le tout est incubé 5 min à T° ambiante . Ce tampon permet la lyse des bactéries.
- 10 ml de Tampon P3 préalablement refroidi dans de la glace sont ajoutés et la solution est mélangée. On obtient dès lors un précipité blanchâtre contenant l'ADN génomique, les protéines ainsi que les débris cellulaires.
- Selon le kit « normal » ou « endofree », l'élimination de ce culot se fait de manière différente :
 - Dans le protocole « normal » : après une incubation sur glace de 30 minutes, le mélange est centrifugé 30 minutes à 4°C à 20 000 g. Le surnageant subit une seconde centrifugation de 15 minutes dans les mêmes conditions.
 - Dans le protocole « endofree » : le mélange est incubé à T° ambiante pendant 10 minutes et le culot est éliminé par filtration sur une colonne Qiafilter. Le filtrat est incubé 30 minutes sur glace en présence de tampon ER dont la composition est secrète et sert à complexer les endotoxines.

- A ce stade-ci des 2 méthodes, l'échantillon est prêt à être déposé sur la colonne échangeuse d'ions (Qiagen tip 500) préalablement équilibrée avec le tampon QBT.
- La colonne est lavée avec 2X30 ml de Tampon QC, ensuite l'ADN est élué avec 15 ml de Tampon QN et récupéré dans des tubes Corex stériles.
- L'ADN est précipité par l'addition de 10,5 ml d'isopropanol à T° ambiante et est centrifugé à 10 000 rpm pendant 30 minutes à 4°C.
- Le culot est lavé avec 5 ml d'éthanol 70% et séché à 37°C avant d'être resuspendu dans 300 à 500 µl d'eau.
- L'ADN est aliquoté et conservé à -20°C.

II.3 Caractérisation de l'ADN préparé

Avant de pouvoir réaliser des transfections, le plasmide doit être quantifié. De plus, nous devons nous assurer qu'il s'agit effectivement du plasmide pCMVβ. Son identité sera vérifiée à l'aide d'enzymes de restriction.

II.3.1 Quantification de l'ADN

- Diluer l'ADN 50X dans du tampon phosphate Na₂HPO₄ 1mM, pH 8,5 et lire l'absorbance à 260 nm dans le « Gene Quant II de Pharmacia Biotech ». Le plasmide étant double brin, sa concentration sera donnée par la relation : 1 unité de DO = 50 µg/ml d'ADN.
- Le rapport A260/A280 donne une idée de la contamination de l'échantillon par des protéines. Pour les transfections, nous travaillons avec un ADN dont le rapport est supérieur ou égal à 1,8.

II.3.2 Restriction de l'ADN

II.3.2.1 Matériel

- Tampon H (Proméga, Réf R008 A) composé de Tris HCl 90 mM pH 7,5, MgCl₂ 10 mM, NaCl 50 mM.
- Enzyme de restriction Cla I (Proméga, Réf : R601A).
- Enzyme de restriction Eco RI (Proméga, Réf : R655A).
- Bleu orange 6X concentré (Proméga, Réf : 6190A).
- Echelle de poids moléculaire 1Kb DNA LADDER (Proméga, Réf : 6571A).
- Agarose (Gibco-BRL, Réf : 15510-019).
- Bromure d'éthidium 500µg/ml (Sigma, Réf : E-8751).

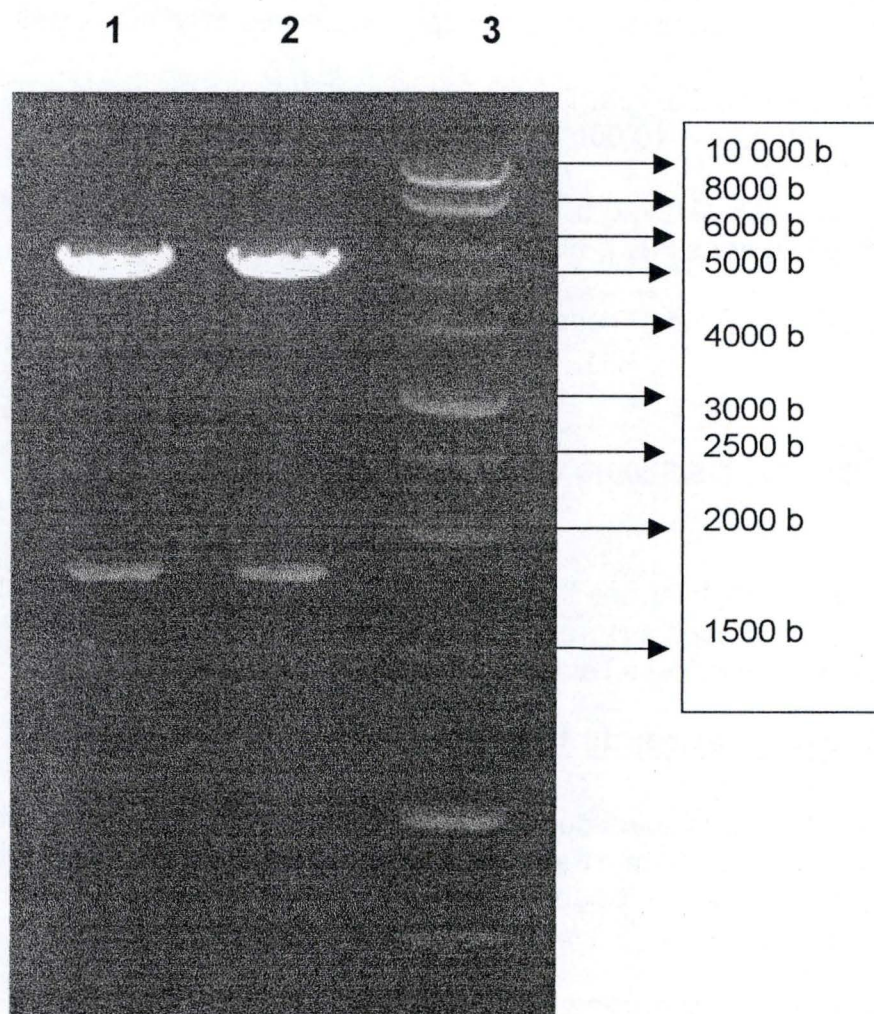


Figure II.2 : Séparation électrophorétique des produits de la restriction du plasmide pCMV β « endofree » préparé dans notre laboratoire (piste 1) et du plasmide pCMV β de PlasmidFactory (piste 2). La piste 3 contient l'échelle des poids moléculaires.

- TBE (Gibco-BRL, Réf : 15581-028) composé de Tris 100 mM, acide borique 90 mM, EDTA 1 mM.
- ADN pCMV β (Clontech, Réf : 6177-1).
- ADN pCMV β (PlasmidFactory, Réf :058-20320).

II.3.2.2 Méthode

- La restriction est réalisée dans un volume total de 25 μ l, dans le tampon H, en présence de 0,5 μ g d'ADN, 6 U de l'enzyme Cla I et 5 U de Eco RI.
- Après une incubation de 1 heure à 37°C, la réaction est arrêtée par l'ajout de 5 μ l de colorant bleu/orange (6X concentré).
- Les échantillons (15 μ l) sont déposés sur gel d'agarose 0,8% préparé de la manière suivante :
 - 0,64 g d'agarose et 80 ml de TBE sont chauffés jusqu'à l'obtention d'une solution limpide.
 - Après l'ajout de 15 μ l de bromure d'éthidium, le gel peut être coulé dans la cuve d'électrophorèse.
 - Le tampon de course est le TBE.
- Afin de pouvoir évaluer la taille des différents fragments, des marqueurs de poids moléculaires sont déposés dans un puits supplémentaire.
- L'électrophorèse est réalisée pendant 2 heures à 100 volts.
- Les fragments d'ADN sont visualisés sous lampe ultraviolet et photographiés.

Sur le gel, nous observons effectivement un premier fragment de poids moléculaire entre 5000 et 6000 et un second fragment entre 1500 et 2000. Ce qui est en accord avec les résultats attendus (figure II.2).

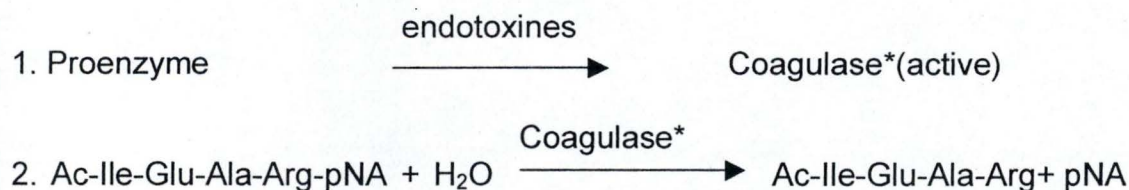
II.4 Dosage d'endotoxines

Afin de vérifier l'absence d'endotoxines dans nos préparations d'ADN, nous effectuerons une mesure du taux d'endotoxines.

Principe de cette méthode :

Cette méthode utilise le lysat de Limule (LAL). Les endotoxines des bactéries Gram négatives catalysent l'activation d'une proenzyme dans le LAL. L'enzyme activée va réagir avec un substrat exogène qui est le peptide Ac-Ile-Glu-Ala-

Arg-pNA (schéma ci-dessous). La réaction libère la pNA (p-nitroaniline) qui peut être détectée à 405 nm. Autrement dit, si on ajoute du LAL dans une solution ne contenant pas d'endotoxine, il n'y aura pas d'activation de la proenzyme et donc pas de réaction avec le substrat. La relation entre l'absorbance et la concentration en endotoxines est linéaire dans la gamme de 0,1 à 1 Eu/ml.



II.4.1 Matériel

- QCL-1000[®] CHROMOGENIC LAL (Bio-Whittaker, Réf : 50-647U) contenant :
 - H₂O sans endotoxines.
 - Endotoxines d'*E. coli* (=étalon).
 - Substrat chromogénique.
 - LAL (Limulus Amebocyte Lysate).
- Acide acétique : (MERCK, Réf : 63) 25 % dans de l'eau désionisée.

II.4.2 Méthode

Il est important de travailler avec de la vaisselle non pyrogénique. Tous les matériaux en plastique sont des matériaux utilisés en culture et la vaisselle en verre a été préalablement stérilisée 5 à 6 heures à 180 °C.

Préparation de la droite d'étalonnage

4 tubes Sterilin contenant respectivement des concentrations en endotoxines de 1 EU/ml, 0,5 EU/ml, 0,25 EU/ml et 0,1 EU/ml sont préparés. Les dilutions seront réalisées avec l'H₂O « endotoxin free ».

Remarque : après chaque dilution vortexer les tubes pendant une minute.

Préparation des échantillons d'ADN

De l'ADN est prélevé pour avoir une concentration finale de 1 µg/50 µl. Les dilutions se font également dans l'H₂O « endotoxin free ».

Dosage dans plaque 96 puits stériles

- 50 µl de chaque dilution standard, d'échantillon et de blanc (H₂O) sont déposés dans les puits d'une plaque 96 puits. Les conditions sont testées en double.

- 50 µl de LAL préchauffé à 37°C sont ajoutés dans tous les puits et sont incubés 10 min à 37°C.
- 100 µl de substrat préchauffé à 37°C sont ajoutés dans tous les puits et sont incubés 6 min à 37°C.
- 50 µl de solution stop, c'est-à-dire d'acide acétique, sont également ajoutés partout.
- La lecture se réalise à 405 nm dans le lecteur Ultramark Microplate Imaging System de Bio-Rad.

II.5 Préparation de polymères

Des polymères sont synthétisés à l' UMH (Université de Mons-Hainaut) et nous sont fournis sous forme lyophilisée afin de les conserver plus longtemps.

Pour les tester, nous les avons solubilisés dans les tampons suivants :

HBS : tampon HEPES 20 mM ; pH 7,4 ; NaCl 0,9%

PBS : tampon phosphate 10 mM ; pH 7,4 ; NaCl 0,9%

Tampon phosphate : 10 mM ; pH 7,4

HEPES : 20 mM ; pH 7,4

Les solutions stock de polymères sont préparées à une concentration de 1 mg/ml de manière suivante :

- Le polymère est pesé dans un tube Sterilin de 10 ml.
- Du tampon stérile est ajouté pour avoir la concentration voulue.
- Le polymère dans le tampon est soumis à une agitation pendant 24h à température ambiante.
- Nous les conservons 1 mois à 4°C.

II.6 Transfection des cellules Cos-7 par les complexes polymère/pCMV β

La transfection peut être définie comme étant l'introduction et l'expression de matériel génétique exogène au sein de cellules eucaryotes.

Elle se réalise avec des cellules Cos-7 encimencées dans des boîtes à douze puits, à raison de 20.000 cellules/puits. Ensuite, les complexes polymère/plasmide pCMV β sont formés et ajoutés aux cellules.

Afin de se rendre compte du taux de transfection, l'activité β -galactosidase sera révélée par 2 méthodes assez rapides et très sensibles qui nous donnent 2 types de renseignements :

- Révélation en colorimétrie :

Elle nous permet de doser l'activité β -galactosidase dans le lysat cellulaire en utilisant le 2-O-nitrophényl β -D-galactopyranoside comme substrat. Le produit de la réaction (le 2-nitrophénol) étant coloré en jaune, sa production peut être quantifiée par une mesure de l'absorbance à 405 nm. Cette méthode colorimétrique est applicable à un grand nombre de conditions et convient bien pour des expériences de criblage.

- Révélation en histochimie :

Elle nous permet de déterminer le nombre de cellules transfectées au sein d'une population en utilisant le X-gal (5-bromo-4-chloro-3-ondolyl β -D-galactopyranoside) comme substrat de l'enzyme, après fixation des cellules.

II.6.1 Matériel

- Plaques 12 puits (Costar, Réf : 3513).
- Plaques 96 puits (Greiner bio-one, Réf : 655101).
- ADN pCMV β : (Clontech, Réf : 6177-1).
- ADN pCMV β : (PlasmidFactory Réf :058-20320)
- SuperFect : 3 mg/ml (Qiagen, Réf : 301305).
- DMEM : (Gibco, Réf : 31 885-023).
- PBS : tampon phosphate 10 mM ; pH 7,4 ; NaCl 0,9%.
- HBS : tampon HEPES 20 mM ; pH7,4 ; NaCl 0,9%.
- Tampon phosphate : 10 mM ; pH 7,4.
- Tampon HEPES : 20 mM ; pH 7,4.
- Substrat pour le dosage de l'activité β -galactosidase :
 - 4,4 mM de 2-O-nitrophényl β -D-galactopyranoside (ONPG)(Acros, Réf : 12 882-0010)
 - 2 mM de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Réf 1.05833.0250)
 - 100 mM de 2-Mercaptoéthanol : (Fluka, Réf : 63690) dans du tampon phosphate 20 mM, pH 7,4.
- PLB : Passive Lysis Buffer : (Proméga , Réf : E 194A).
- M-PER : Mammalian Protein Extraction Reagent (Pierce, Réf : 78501)
- Solution de fixation pour le test histochimique:
 - Formaldéhyde 2%: (Belgolabo, Réf : 494002)
 - Glutaraldéhyde 0,2% : (Fluka, Réf : 49629) dans du PBS.

- Solution de coloration pour le test histochimique : (β -gal staining set, Roche, Réf : 1828673).
 - X-gal solution 5%.
 - Iron buffer : ferrocyanure de potassium et ferricyanure de potassium dans tampon phosphate (PBS) 95%.
 -

II.6.2 Méthode

II.6.2.1 Ensemencement des cellules :

Les cellules sont repiquées la veille (en début d'après-midi) dans une plaque multipuits (12 puits) à raison de 20 000 cellules par puits dans 1 ml de milieu DMEM complet. Voir matériel-méthode paragraphe II.1 : culture de cellules Cos-7.

II.6.2.2 Transfection :

- La préparation des complexes se réalise sous hotte à flux laminaire vertical dans un volume final de 75 μ l. Les volumes et quantités données ici correspondent à ce qui est utilisé par puits.
- 1 μ g ADN est dilué dans le tampon : soit PBS, HBS, HEPES, tampon phosphate pour les polymères, soit dans du DMEM pour le SuperFect.
- Le polymère est ensuite ajouté dans le rapport polymère/ADN choisi (w/w). Le tout est incubé 30 minutes à température ambiante pour la formation des complexes. Pour le Superfect (SF), le temps d'incubation n'est que de 15 minutes. Le SF va nous servir de référence et le rapport SF/ADN choisi est 6/1 (w/w).
- 425 μ l de DMEM seul sont ajoutés aux tubes contenant les complexes de transfection.
- Les complexes sont transférés sur les cellules préalablement lavées au PBS et sont incubés 3 h à 37°C, 5 % CO₂.
- Les cellules sont lavées avec 1 ml de DMEM.
- 1 ml de milieu de base + 5 % sérum est ajouté par puits et les cellules sont incubées à 37°C, 5% CO₂ pour 24 heures.

II.6.2.3 Révélation de la β -galactosidase

II.6.2.3.1 *En colorimétrie*

- Les cellules sont rincées 2 fois avec 1 ml de PBS non stérile préchauffé à 37°C.

- 200 µl de tampon de lyse (PLB ou M-PER) sont ajoutés. Les plaques sont ensuite incubées 15 minutes sur un vortex rotatif.
 - Dans le cas du PLB, le lysat est transvasé dans un eppendorf et est centrifugé 3 min à 13000 rpm pour éliminer les débris cellulaires, membranes plasmiques ... qui se retrouvent dans le culot.
 - Si le tampon de lyse est le M-PER, le dosage peut être effectué directement.
 - A 100 µl d'échantillon (ou 100 µl de tampon de lyse) sont ajoutés 100 µl de substrat β -gal, dans une plaque 96 puits.
 - Pour les puits contenant le SF (qui sert de référence), le dosage se fait pour 3 dilutions :
 - 10 µl d'échantillon + 90 µl de tampon de lyse
 - 20 µl d'échantillon + 80 µl de tampon de lyse
 - 30 µl d'échantillon + 70 µl de tampon de lyse
- et 100 µl de substrat β -gal sont également ajoutés.
- Après 30 min d'incubation à 37°C l'absorbance est lue à 405 nm dans le Microplate Imaging System de Bio-Rad.

II.6.2.3.2 En histochimie

- Les cellules sont rincées au PBS (1ml/puits).
- 1 ml de fixateur est ajouté par puits (15 minutes à température ambiante).
- Les cellules sont rincées 3 fois au PBS (1 ml/puits).
- 500 µl de solution colorante 1/20 sont ensuite ajoutés.
- Une incubation 30 à 60 minutes à 37 °C est requise.
- Les cellules sont à nouveau rincées 3 fois au PBS (1 ml/puit).
- Les cellules bleues correspondant aux cellules transfectées sont comptées au microscope.

II.7 Dosage de protéines (Folin)

Le dosage des protéines permet d'avoir une estimation de la toxicité des polymères sur les cellules. Il se réalise parallèlement à la révélation colorimétrique, c'est-à-dire 24h après la transfection par la méthode du Folin.

Le NaOH va lyser les membranes cellulaires et va dénaturer les protéines qui exposent de cette façon leurs groupements réactionnels aux réactifs utilisés. Le complexe phosphomolybdate/ phosphotungstate du réactif de Folin est réduit

en un produit de couleur bleue par les résidus tryptophane, tyrosine et cystéine des protéines. Ce test est réalisé en présence d'ions cuivriques car ceux-ci, en se liant aux liaisons peptidiques, rendent ces acides aminés encore plus réducteurs. L'intensité de la coloration bleue est mesurée à 750 nm au spectrophotomètre et est proportionnelle à la quantité de protéines présentes (Lowry et al, 1951).

II.7.1 Matériel

- Etalon : BSA préparé à 200 µg/ml dans de l'H₂O (Sigma)
- NaOH 0,5 N (Merck, Réf : 6498).
- NaOH 1 N (Merck, Réf : 6498).
- Solution CTC :
 - Na₂CO₃ 2% (Merck, Réf : 6392)
 - Tartrate 0,02% (Merck, Réf : 8087)
 - CuSO₄ 0,01% (Merck, Réf : 2790)
- Folin (Merck, Réf : 9001) dilué 2 fois dans de l'H₂O.

II.7.2 Méthode

- Les cellules sont lysées avec 200 µl de NaOH 0,5 N et sont laissées en contact 30 minutes à température ambiante.
- La solution Etalon est préparée de manière suivante : 100 µl de BSA 200 µg/ml sont dilués 2 fois avec du NaOH 1 N et sont laissés 30 minutes à température ambiante.
- Les 200 µl d'échantillons et 200 µl de standard BSA sont transvasés dans des tubes en plastique.
- 1 ml de CTC est ajouté à chaque tube et la solution est incubée 10 minutes.
- 0,1 ml de Folin est ensuite ajouté.
- La lecture se réalise 30 minutes plus tard à 750 nm.

II.8 Technique d'immunocytochimie

Cette technique nous permet de caractériser le cheminement intracellulaire des complexes polymères/ADN et SF/ADN depuis la membrane jusqu'au noyau au moyen du microscope confocal.

Principe :

1. *marquage des différents compartiments cellulaires*

Des anticorps primaires sont utilisés pour marquer des protéines spécifiques des membranes de différents compartiments cellulaires :

la protéine **EEA1** pour les endosomes précoces ;
la protéine **Rab-7** pour les endosomes tardifs.

Ensuite, des anticorps secondaires, couplés à un fluorochrome, sont dirigés contre ces anticorps primaires. Ce qui permet de visualiser ces compartiments cellulaires au microscope confocal.

2. *marquage des noyaux*

L'ADN endogène est marqué avec du TOPRO-3, une molécule qui devient fluorescente lorsqu'elle s'intercale entre les bases de l'ADN .

3. *marquage des complexes*

Le plasmide pCMV β doit être préalablement marqué avant de réaliser la transfection, avec des molécules de YOYO-1 qui deviennent fluorescentes lorsqu'elles s'intercalent entre les bases de l'ADN. Cette méthode est applicable dans le cas du SuperFect et des polymères (Ogris et al, 2000) .

II.8.1 Matériel

- Mowiol (Aldrich, Réf : 32 459-0) préparé dans du tampon PBS 30% glycérol (Merck, Réf : 4094).
- PBS : tampon phosphate 10 mM pH 7,4 ; NaCl 0,9%
- BSA : bovine serum albumin 2% dans du PBS (Réf : Sigma : A-4503)
- Triton : 1% dans du PBS (X-100, Sigma, Réf : T-9284)
- Paraformaldéhyde : 4% dans du PBS (Merck, Réf : 4005)

- Anticorps primaires :
 - Anti Rab-7 (Santa-Cruz, Réf : 10767, Immunoglobulines de lapin)
 - Anti EEA1 (Santa-Cruz, Réf : 0780, Immunoglobulines de chèvre)

- Anticorps secondaires :

- Immunoglobulines de chèvre anti-lapin , Alexa Fluor 568 (Molecular Probes, Réf : A-11011)
- Immunoglobulines d'âne anti-chèvre, Alexa Fluor 568 (Molecular Probes, Réf : A-11057).
- TOPRO-3 (Molecular Probes, Réf : T-3605)
- RNase 2 mg/ml dans PBS (ICN, Réf : 9973B)
- YOYO-1 (Molecular Probes, Réf Y-3601)

II.8.2 Méthode

- Les cellules ont été repiquées dans des plaques 24 puits sur des couvre-objets en verre à raison de 20 000 cellules/puits
- Le lendemain, les cellules sont transfectées avec de l'ADN complexé à des molécules de YOYO-1 (cf. II.6.2.2). Le complexe ADN/YOYO, doit être préalablement formé pendant 30 minutes dans l'obscurité avant l'ajout du polymère (ou SuperFect) (une molécule de YOYO-1 pour 300 paires de bases dans le cas des polymères ou une molécule de YOYO-1 pour 600 paires de bases dans le cas du SuperFect).
- A des temps déterminés après transfection (30 minutes à 4 heures), les couvre-objets sont ôtés du milieu et rincés au PBS préchauffé à 37°C.
- Les cellules sont ensuite fixées avec de la PFA 4 % à 4°C pendant 10 min (minimum 300 µl/puits).
- Les cellules sont rincées 3 fois au PBS préchauffé à 37°C et sont perméabilisées au PBS+Triton 1 % durant 5 min.
- 3 rinçages de PBS/BSA sont requis (laisser 10 min par rinçage).
- Anticorps primaire : 30 µl d'anticorps dilués 50 fois sont déposés sur un morceau de parafilm placé en chambre humide. Le couvre-objet est retourné sur la goutte d'anticorps. L'incubation est de 2h à température ambiante.
- Les couvre-objets sont remis dans la boîte de culture en les retournant à nouveau.
- 3 rinçages de PBS/BSA sont requis (laisser 10 min par rinçage).
- Pour les anticorps secondaires, nous procédons de la même manière (excepté qu'ils sont dilués 250 fois). L'incubation est de 1h à l'abri de la lumière pour préserver les fluorochromes.
- Les cellules sont rincées 3 fois au PBS.

- L'ADN endogène est marqué au TOPRO-3. C'est le même procédé que pour l'anticorps secondaire mais 30 minutes en chambre humide suffisent
- Les cellules sont à nouveau rincées 3 fois au PBS.
- Les lamelles couvre-objets sont montées au Mowiol.
- L'analyse au microscope confocal peut dès lors se faire (Leica TCS-SP1).

III RESULTATS

Les résultats que nous présentons, comme déjà signalé dans l'objectif du mémoire, sont divisés en 2 parties :

Une première partie, plus appliquée, qui s'intègre dans un projet de recherche appliquée, financée par la Région Wallonne, consiste à tester des polymères en transfection.

L'optimisation des polymères peut se faire à deux niveaux :

Premièrement, un travail de recherche des conditions optimales de transfection pour les polymères poly(MADAM) sera effectué.

Chaque polymère est d'office testé à plusieurs rapports polymère/ADN mais en plus, il faut également tenir compte d'autres paramètres comme :

- le tampon de complexation,
- la qualité de l'ADN pCMV β , de forme ouverte ou superenroulée, contenant ou non des endotoxines,
- le mode de préparation des complexes.

Deuxièmement, des polymères poly(MADAM) avec des amorces PEO (figure III.3) seront également testés en transfection sur les cellules Cos-7 afin de voir si :

- ces polymères transfectent les cellules Cos-7 et avec quelle efficacité,
- l'amorce de PEO diminue la toxicité des complexes vis-à-vis des cellules par rapport aux complexes poly(MADAM)/ADN sans PEO,
- l'amorce de PEO joue un rôle de protection, empêchant l'interaction des protéines du sérum avec les complexes en comparant leur efficacité de transfection avec celle des complexes poly(MADAM)/ADN sans PEO.

Une deuxième partie, plus fondamentale, nous permettra peut-être de comprendre pourquoi les polymères transfectent moins efficacement que le SuperFect, en étudiant le cheminement intracellulaire des complexes par microscopie confocale.

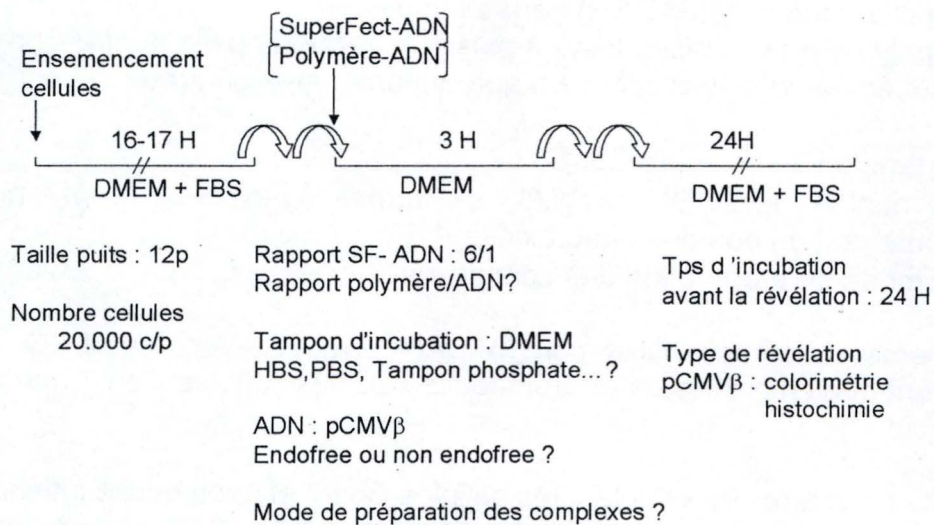


Figure III.1 : Etapes principales d'une expérience de transfection (pour détails, voir texte), avec les paramètres à optimiser pour les polymères.

III.1 Présentation générale des polyplexes et protocoles utilisés

III.1.1 Choix du gène rapporteur

L'ADN choisi pour réaliser nos transfections est le plasmide pCMV β . Il possède :

- une origine de réplication pour se multiplier dans *E. coli*,
- un gène de résistance à l'ampicilline pour sélectionner les bactéries qui ont été transformées sur le milieu avec ampicilline, c'est-à-dire les bactéries qui ont intégré le plasmide,
- le promoteur fort de CMV (cytomégalovirus) devant le gène Lac Z qui code l'enzyme de la β -galactosidase (β -gal) de *E. coli*.

Nous avons choisi ce plasmide car pour un même ADN, deux méthodes de révélation peuvent être utilisées, donnant des renseignements complémentaires :

- d'une part, une méthode histochimique, permet de déterminer le nombre de cellules transfectées au sein d'une population en utilisant le X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranoside) comme substrat de l'enzyme (après fixation des cellules). Les cellules transfectées deviennent bleues et peuvent être comptées au microscope.
- d'autre part, la méthode colorimétrique nous permet de doser l'activité β -galactosidase dans le lysat cellulaire en utilisant le 2-O-nitrophényl β -D-galactopyranoside comme substrat. Le produit de la réaction (le 2-nitrophénol) étant coloré en jaune, sa production peut être quantifiée par une mesure de l'absorbance à 405 nm. Cette méthode colorimétrique est applicable à un grand nombre de conditions et convient bien pour des expériences de criblage (Matériels et méthodes Point II.6).

III.1.2 Choix de l'agent de transfection de référence

Le SuperFect (SF) est un polycation de type dendrimère, commercialisé par la firme Qiagen. Il a été choisi comme agent transfectant de référence et il est repris dans toutes nos manipulations comme contrôle positif. Les paramètres de transfection pour le SF ont été mis au point avant le début de ce travail. La figure III.1 reprend de manière schématique, le principe d'une expérience. Brièvement, les cellules sontensemencées dans des plaques à 12 puits à raison de 20 000 cellules par puits, dans du milieu de culture avec sérum (FBS). Le lendemain, les complexes SuperFect/ADN (dans un rapport pondéral

de 6/1, avec 1 μ g d'ADN engagé par puits) sont formés dans du DMEM (sans sérum) et ajoutés aux cellules pour une période de 3 heures. L'excès de complexes est ensuite éliminé. Les cellules sont incubées 24 heures dans du milieu avec sérum avant la révélation de l'activité β -galactosidase.

III.1.3 Protocole de transfection avec les polymères

Il est évident que certains paramètres définis pour le protocole SuperFect doivent être adaptés pour les polymères. Dans les premières expériences avec les polymères, le protocole a été calqué sur celui utilisé pour le SuperFect, mais deux différences ont été apportées :

- Le tampon de formation des complexes utilisé avec les polymères est le tampon HBS (HEPES 20 mM ; pH7,4 ; NaCl 0,9%) au lieu du DMEM comme pour le SuperFect. Il y a deux raisons pour lesquelles nous avons fait ce choix :
 - Premièrement, dans la littérature, le HBS est un tampon souvent utilisé dans le cas des polymères de méthacrylate (van de Wetering et al, 1999).
 - Deuxièmement, des complexes réalisés dans trois milieux différents (DMEM, PBS et HBS) ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose, après coloration de l'ADN au bromure d'éthidium. L'ADN étant chargé négativement, il est sensible au champ électrique et migre dans le gel. Par contre, si l'ADN est complexé, les charges sont neutralisées et l'ADN reste dans les puits. Force a été de constater qu'il fallait un rapport polymère/ADN plus faible pour obtenir une complexation dans le cas de l'HBS par comparaison au PBS et au DMEM. Au vu de ces résultats, l'équipe a décidé d'utiliser le tampon HBS pour réaliser les transfections.
- Le temps de formation des complexes pour le polymères est de 30 minutes au lieu de 15 minutes pour le SuperFect. Nous nous sommes également référés à la littérature pour définir ce paramètre (Van de Wetering, 1998).

Nous sommes conscients que l'optimisation de nouveaux vecteurs de transfection doit se faire à deux niveaux, indissociables l'un de l'autre : rechercher la structure du polymère la plus favorable à la transfection, mais aussi optimiser les conditions de transfection pour ce polymère.

C'est pourquoi un effort constant est fourni pour continuer à optimiser les protocoles de transfection.

Chaque nouveau polymère est d'emblée testé à différents rapports massiques polymère/ADN, mais comme nous allons le voir, d'autres paramètres sont également importants et doivent être pris en compte. Ce sera abordé au Point III.2. Nous allons d'abord présenter les polymères utilisés dans ce travail.

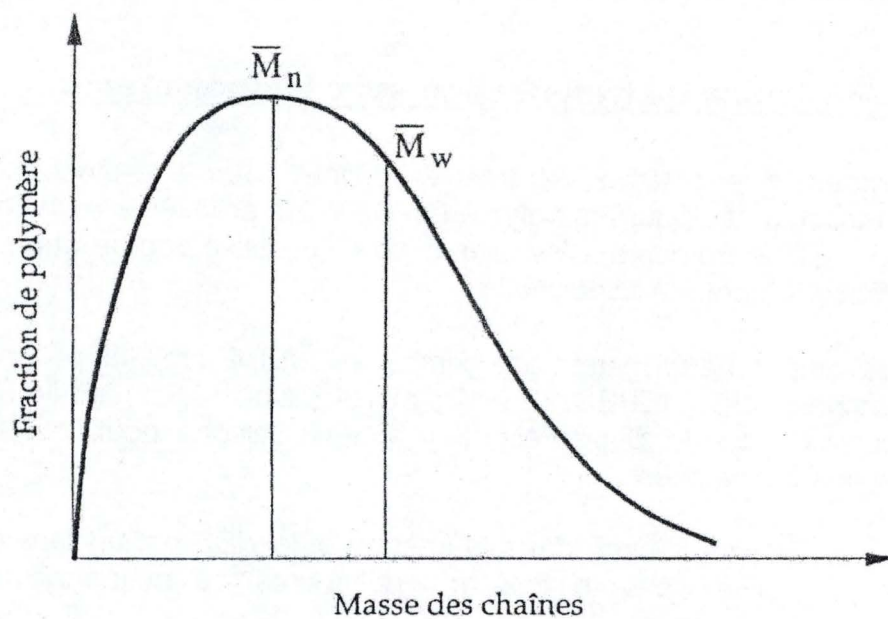


Figure III.2 : Distribution des masses moléculaires avec les moyennes en nombre \overline{M}_n et en poids \overline{M}_w

III.1.4 Caractéristiques des polymères utilisés

Les polymères synthétisés par le Service de Matériaux Polymères et Composites (SPMC) de Mons, ont une dorsale de méthacrylate de 2-(diméthylamino)éthyl (MADAM). Ils sont obtenus par polymérisation par voie radicalaire de monomères de MADAM. La polymérisation est une réaction en chaîne ne conduisant pas à la formation d'une chaîne de polymère unique mais à un ensemble de chaînes de longueurs et de poids moléculaire (M_n) différents. Pour chaque échantillon, nous obtenons une distribution de masse comme celle illustrée à la figure III.2 et nous pouvons définir les paramètres suivants :

$$\overline{M_n} = \text{masse moyenne en nombre} : \frac{\sum_i n_i M_i}{\sum_i n_i}$$

$$\overline{M_w} = \text{masse moyenne en masse} : \frac{\sum_i n_i M_i^2}{\sum_i n_i M_i}$$

Et $D = \text{polydispersité} = \frac{\overline{M_w}}{\overline{M_n}} \geq 1$, elle reflète la largeur de la distribution.

Où n_i = nombre de chaînes de degré de polymérisation i

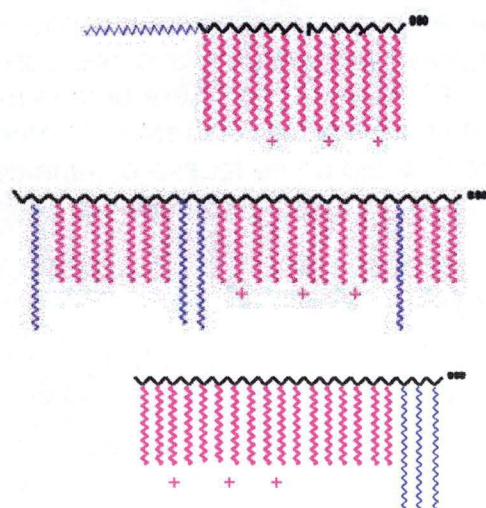
$$\frac{n_i}{\sum_i n_i} = \text{fraction en nombre de chaque espèce présente}$$

M_i = masse molaire d'une chaîne de degré de polymère i .

L'originalité du projet Polyplex vient de l'utilisation d'une méthode de polymérisation par voie radicalaire contrôlée (qui permet d'obtenir des polymères avec des dispersités de l'ordre de 1,1 – 1,3). En comparaison, les synthèses de polymères de méthacrylate décrites dans la littérature, qui se font par voie radicalaire conventionnelle, présentent des D pouvant atteindre une valeur de 11 (van de Wetering et al, 1999).

Nous avons travaillé avec deux types de polymères :

- des homopolymères de méthacrylate de 2-(diméthylamino)éthyl ou MADAM. Ce polymère, appelé poly(MADAM), est porteur de fonctions amines qui peuvent se protoner à pH physiologique et qui sont responsables de la liaison à l'ADN.



A . Homopolymérisation du MADAM à partir d'une amorce amorce PEO

B . Copolymérisation statistique

C . Copolymérisation en bloc

Figure III.3 : Représentation schématique des trois familles de polymères avec PEO synthétisées par le SMPC à l'UMH.

Type	Nom	Polymérisation Conv. ATRP	Mn Da	D
Poly(MADAM)	NAPA C18	x	91 400	4,25
	NAPA C39 b	x	19 600	1,23
	SEMO B22	x	13 000	1,35
	MIWA A9	x	19 700	1,15
	MIWA A23	x	26 400	1,17
	MIWA A25	x	37 500	1,18
Poly(MADAM) avec amorceur PEO de 10	MIWA A33	x	18 900	1,23
	SEMO B30	x	24 000	1,23
	MIWA A35	x	30 800	1,3

Tableau III.1: Tableau récapitulatif des différents polymères utilisés en transfection au cours de ce mémoire. Le Mn correspond à la masse de la chaîne de polyMADAM la plus fréquemment rencontrée dans la synthèse. L'amorce PEO est une chaîne de 10 éléments PEO ($PM \pm 450$). Le NAPA C18 est polymérisé selon la méthode radicalaire conventionnelle et les autres polymères, selon la méthode radicalaire ATRP (Atom Transfer Radical Polymerization).

- des copolymères de MADAM et de MAPEO (méthacrylate de poly(éthylèneglycol) méthyl éther). Les rôles du polyéthylène glycol (ou polyoxyde d'éthylène – PEO) sont multiples. Il permet une meilleure solubilisation du polymère et des complexes. Il diminue l'agrégation des complexes. Il diminue le phénomène d'opsonisation, quand les complexes sont injectés par voie intraveineuse. Enfin, il diminue la toxicité éventuelle des complexes vis-à-vis des cellules.

Les éléments MADAM et PEO peuvent être combinés de différentes manières. Les polymères suivants ont été synthétisés (figure III.3) :

- des polymères poly(MADAM) avec une amorce PEO dans le prolongement de la dorsale (figure III.3A),
- des polymères poly(MADAM) avec des chaînes de PEO insérées latéralement et aléatoirement par rapport à la dorsale, appelés copolymères statistiques (figure III.3B),
- et des polymères poly(MADAM) avec des chaînes de PEO insérées latéralement en bloc par rapport à la dorsale, appelés copolymères à blocs (figure III.3C).

Pour chaque famille de polymères, nous avons reçu des échantillons correspondant à des longueurs de chaîne poly(MADAM) variables.

Dans le cadre de ce mémoire, nous avons travaillé avec les homopolymères de MADAM : NAPA C18, NAPA C39b, SEMO B22, MIWA A9, MIWA A23 et MIWA A25, ainsi qu'avec les co-polymères de MADAM contenant une amorce PEO de 10 éléments : MIWA A33, SEMO B30 et MIWA A35 (tableau III.1). Les polymères NAPA C18, NAPA C39b et SEMO B22 sont les polymères utilisés au début de ce mémoire, les autres nous ont été fournis plus tard.

Le polymère NAPA C18 est le seul polymère obtenu par synthèse conventionnelle. Il a un M_n 3 à 9 fois supérieur aux autres polymères et la dispersité atteint une valeur de 4,25. Le M_n le plus souvent rencontré est de 91 400 Da mais des polymères de 388 400 Da ou plus existent au sein de la préparation.

Les autres polymères ont été synthétisés par la méthode radicalaire contrôlée et présentent une faible dispersité. Par exemple, pour le MIWA A9, le M_n le plus rencontré est de 19 700 Da et la polydispersité est de 1,15. Il existe des polymères de M_n de 22 700 Da dans cette synthèse.

Avec ces polymères, nous pourrions comparer des polymères poly(MADAM) de M_n croissants. Nous pourrions également comparer l'action d'un polymère poly(MADAM) et celle d'un co-polymère poly(MADAM) avec amorce PEO dans la même gamme de M_n (par exemple MIWA A9 et MIWA A33 ou MIWA A25 et MIWA A35). Signalons que par rapport aux données de la littérature, les polymères utilisés dans ce projet sont de M_n plus réduit, ce qui les rend plus biocompatibles.

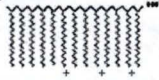
Type	Nom	Polymérisation Conv.	ATRP	Mn Da	D
Poly(MADAM) 	NAPA C18	x		91 400	4,25
	NAPA C39 b		x	19 600	1,23
	SEMO B22		x	13 000	1,35

Tableau III.2 : Tableau récapitulatif des différents polymères utilisés pour la mise au point du protocole de transfection.

Manipulateur	Activité β -gal /puits
DF 02	4,15 \pm 0,18
DF 08	2,44 \pm 0,18
MVS 27	4.62 \pm 0,8
SP 22	3,85 \pm 0,4

Tableau III.3 : variabilité de l'activité β -gal/puits d'une manipulation à l'autre pour le rapport SEMO B22 /pCMV β de 10/1.

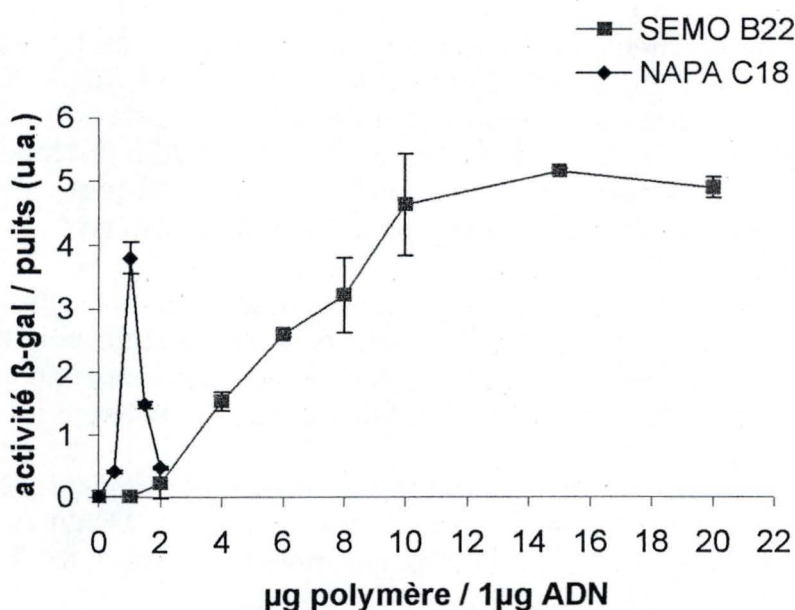


Figure III.4 : Influence du rapport polymère/ADN sur le taux de transfection. Des cellules Cos-7,ensemencées à raison de 20 000 cellules par puits, sont transfectées avec les complexes SEMO B22/pCMV β ou NAPA C18/pCMV β . L'activité β -gal a été quantifiée après 24h par un test colorimétrique. Les résultats sont exprimés comme la moyenne \pm l'écart type de 2 déterminations.

III.2 Recherche des conditions optimales de transfection avec les polymères

Comme déjà signalé au point III.1.3, l'optimisation d'un protocole de transfection fait intervenir de nombreux paramètres. Nous avons donc voulu dégrossir le problème en nous limitant à quelques polymères disponibles au début de ce travail. Ils sont repris dans le tableau III.2.

III.2.1 Influence du rapport polymère/ADN sur le taux de transfection

III.2.1.1 Méthode colorimétrique

Chaque fois qu'on reçoit un nouveau polymère, il est testé en transfection sur les cellules Cos-7 dans différents rapports de masse polymère/ADN (de 1/1 à 20/1).

La figure III.4 illustre une expérience réalisée avec deux types de complexes forts différents, formés à partir de SEMO B22 (Mn de 13 000 Da) ou de NAPA C18 (Mn de 91 400 Da). L'axe des abscisses présente les différents rapports polymère/plasmide utilisés et celui des ordonnées l'expression moyenne de l'activité enzymatique β -gal par puits. Cette activité est exprimée en unités arbitraires (u.a.) : les échantillons sont dilués pour le dosage de l'activité β -gal, et ce de manière différente pour le SF et les complexes. Les valeurs brutes d'absorbance sont remultipliées par le facteur de dilution pour obtenir les valeurs d'activité totale par puits et pour pouvoir comparer les conditions entre elles.

Dans le cas du polymère SEMO B22, l'activité β -gal augmente jusqu'au rapport 10/1, un plateau est ensuite atteint. Nous remarquons que le polymère NAPA C18 transfecte plus efficacement pour un rapport 1/1. Nous expliquons cela par le fait que le Mn du NAPA C18 est bien supérieur à celui du polymère SEMO B22. Il semble donc que plus le polymère a un Mn élevé, moins il faudrait de polymères pour former des complexes.

Bien que la variabilité des résultats ne soit pas excessive au sein d'une expérience, d'une manipulation à l'autre, les résultats peuvent être cependant très hétérogènes en terme d'activité maximale obtenue pour le rapport polymère/ADN optimal (tableau III.3). Cela signifie que nous ne contrôlons pas tous les paramètres de transfection.

Par souci de clarté, nous n'avons pas repris dans la figure III.4, l'activité β -gal des cellules transfectées avec le SF. Sur l'ensemble des expériences réalisées, celle-ci varie entre 10 et 18 u.a.

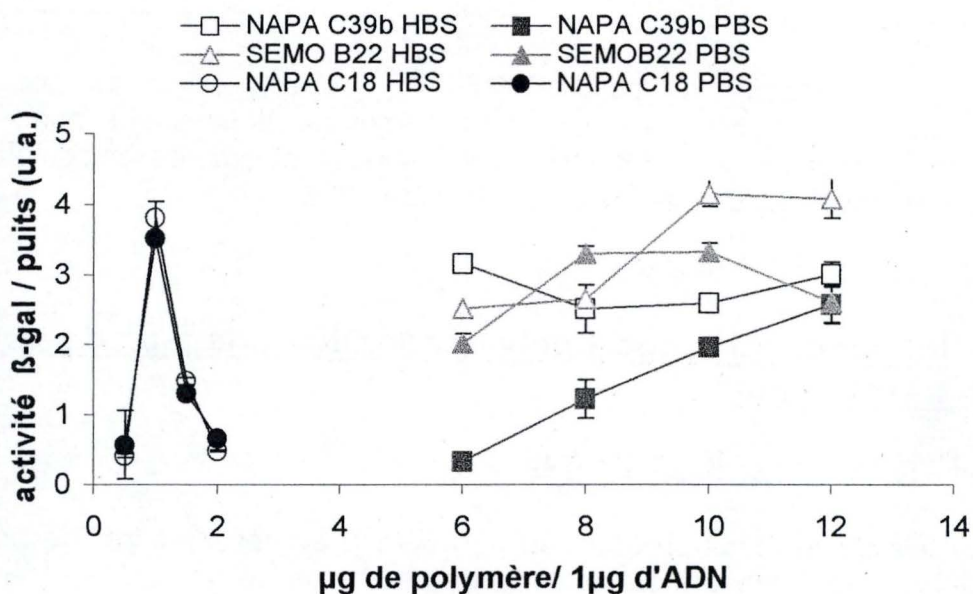


Figure III.6 : Influence du tampon de complexation polymère/ADN sur le taux de transfection des cellules Cos-7. Les cellules ont été transfectées par les complexes SEMO B22/pCMV β , NAPA C18/pCMV β et NAPA C39/pCMV β préparés dans 2 tampons différents : l'HBS et le PBS. L'activité β -gal a été quantifiée après 24h par un test colorimétrique. Les résultats sont exprimés comme la moyenne \pm l'écart type de 2 déterminations.

Polymère	Activité β -gal/puits	
	NAPA C39	SEMO B22
HBS	3,17 \pm 1,29 (n=9)	4,20 \pm 0,39 (n=3)
PBS	2,41 \pm 0,69 (n=4)	3,19 \pm 1,22 (n=3)
Tampon phosphate		3,49 \pm 1,48 (n=5)

Tableau III.4 : tableau récapitulatif reprenant les différents résultats de transfection, obtenus avec les polymères NAPA C39b et SEMO B22 dans les tampons HBS et PBS (rapport polymère/ADN utilisé = 10/1 pour chacun). Les résultats sont exprimés comme la moyenne de l'activité β -gal/puits \pm DS de 3 déterminations. n est le nombre d'expériences indépendantes réalisées par l'équipe Polyplex entière.

III.2.1.2 Méthode histochimique

Les tests en histochimie nous permettent d'obtenir le pourcentage de cellules transfectées. Un exemple est illustré à la figure III.5 où des cellules Cos-7 ont été transfectées par des complexes SEMO B22/pCMV β ou SF/pCMV β . Plusieurs photos ont été prises par puits (2 puits par condition) et le pourcentage de cellules transfectées (cellules bleues) est déterminé par comptage cellulaire. Moins de 0,5 % des cellules sont positives pour la β -gal dans le cas des complexes SEMO B22/pCMV β et 6,3 % pour les complexes SF/pCMV β .

III.2.2 Influence du tampon sur le taux de transfection

Comme mentionné précédemment, au début de ce travail, nous réalisons la formation des complexes dans du HBS (HEPES 20 mM ; pH 7,4 ; NaCl 0,9%). Le tampon HBS a été choisi au départ par l'équipe pour les deux raisons mentionnées ci-dessus.

Les chercheurs de Liège nous ont signalé que le tampon HBS n'est pas injectable à l'homme car il est toxique pour l'organisme. Ils préconisent le tampon PBS (tampon phosphate 10 mM ; pH 7,4 ; NaCl 0,9%).

Suite à ces informations, nous avons préparé des complexes dans les deux tampons et nous les avons testés en transfection (figure III.6).

Pour le polymère NAPA C18, aucune différence n'a été décelée entre les deux tampons. Par contre pour le polymère NAPA C39b, le taux de transfection est déjà maximal pour le rapport 6/1 lorsque les complexes sont formés dans le HBS, alors que ce même taux n'est qu'atteint qu'au rapport 12/1 quand nous travaillons dans le PBS. Pour le polymère SEMO B22, l'activité β -gal maximale est légèrement plus élevée quand les complexes sont préparés dans le tampon HBS. En conclusion, pour certains polymères testés, le tampon PBS semble moins favorable que le HBS à un taux élevé de transfection.

Au sein d'une manipulation, le tampon HBS semble être un tampon plus adéquat que le PBS mais si nous regardons les activités β -gal moyennes sur l'ensemble des expériences réalisées dans les deux conditions, cette conclusion est moins évidente (tableau III.4).

Il est à noter que la formation des complexes a été testée également dans le tampon phosphate (sans NaCl). Des auteurs ont montré qu'en présence de sel, la taille des complexes est plus importante (Rungsardthong et al, 2001), ce qui pourrait entraver la transfection. Dans nos mains, le tampon phosphate ne donne pas de meilleurs résultats que le tampon HBS (non montré).

En conclusion, dans un premier temps, nous continuons à tester nos polymères *in vitro* dans le tampon HBS, pour se trouver dans les conditions optimales de transfection. Pour la suite du projet, lorsque l'équipe travaillera *in vivo*, les complexes seront formés dans le tampon PBS étant donné que nous ne pouvons pas injecter de l'HBS dans l'organisme.

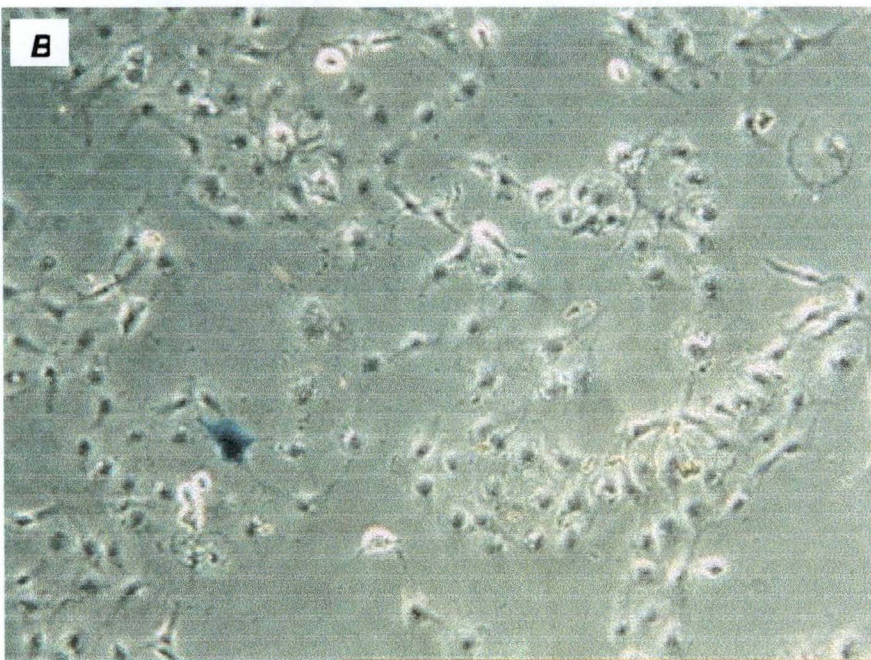
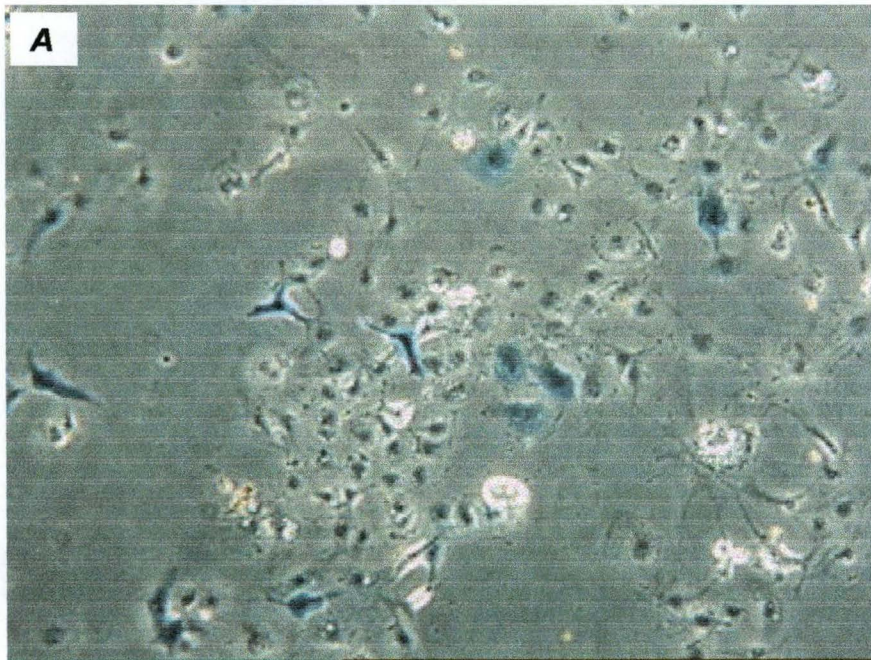


Figure III.5 : Révélation histochimique de la β -gal dans des cellules Cos-7 transfectées par les complexes SF/ pCMV β (A) et SEMO B22/pCMV β (B).

Préparation d'ADN	Taux d'endotoxines (EU/ μ g d'ADN)
ADN "endofree"	
culture 1 clone 1	0,11
clone 2	0,18
culture 2 clone 1	0,04
clone 2	0,02
ADN "normal"	
culture 1	1,3
culture 2	0,9
culture 3	1,28
culture 4	1,29

Tableau III.5 : Quantités d'endotoxines dosées pour différentes préparations d'ADN « normal » et « endofree ». Les résultats sont exprimés comme la moyenne de 2 déterminations.

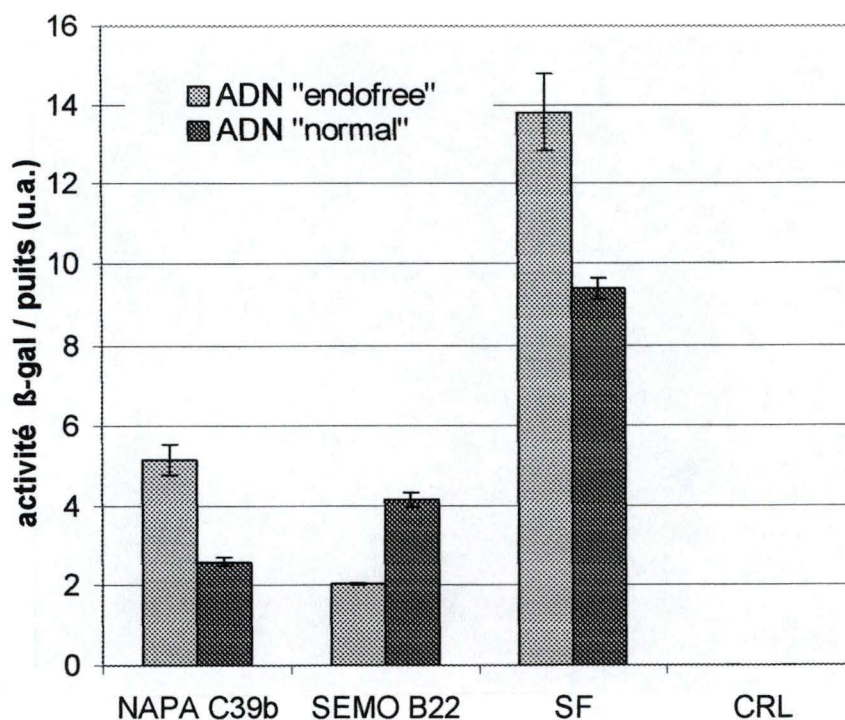


Figure III.7 : Influence de la présence d' endotoxines sur le taux de transfection. Des cellules Cos-7 sont transfectées avec les complexes SF/pCMV β , SEMO B22/pCMV β et NAPA C39b/pCMV β . Le rapport polymère/ADN est de 10/1 dans chaque cas. L'activité β -gal a été quantifiée après 24h par un test colorimétrique. Les résultats sont exprimés comme la moyenne \pm l'écart type de 2 déterminations.

III.2.3 Influence de la qualité de l'ADN sur le taux de transfection

III.2.3.1 Présence d'endotoxines

Les bactéries *E. coli*, utilisées pour l'amplification de l'ADN, peuvent libérer des endotoxines (lipopolysaccharides contenus dans la membrane externe des bactéries Gram négatives) qui sont entraînées avec l'ADN au cours de la purification. Ces endotoxines peuvent interférer avec la formation des complexes et donc influencer l'efficacité de transfection (Weber, 1995). De plus, si on veut faire de la thérapie génique, il n'est pas pensable d'injecter de l'ADN contenant des endotoxines.

La firme Qiagen propose 2 kits de préparation de l'ADN :

- le premier ne tient absolument pas compte de la présence éventuelle d'endotoxines dans les échantillons,
- le second comprend une étape supplémentaire permettant d'éliminer ces endotoxines.

De l'ADN pCMV β a été préparé par ces 2 méthodes. Nous les appellerons respectivement pCMV β « normal » et pCMV β « endofree ».

Une première observation est le rendement global très faible du protocole « endofree ». Pour un tiers des cultures de bactéries, nous n'avons pas obtenu d'ADN par ce protocole. Ce qui veut dire, qu'avec cette méthode nous devons souvent repréparer de l'ADN, ce qui représente un risque supplémentaire de variabilité.

Nous avons vérifié l'absence d'endotoxines dans les préparations « endofree ». Le principe de la mesure est le suivant : les endotoxines catalysent l'activation d'une proenzyme contenue dans le LAL (lysate de limule). Si les endotoxines sont présentes dans le milieu, l'enzyme est activée et va réagir avec un substrat exogène. Cette réaction va libérer un produit qui peut être détecté à 405 nm (Matériels et méthodes, Point II.4).

L'ADN est considéré comme dépourvu d'endotoxines à 0,1 EU/ μ g d'ADN (EU = unités d'endotoxines) par la firme PlasmidFactory (Bielefeld-Allemagne) et 0,03 EU/ μ g par la firme Eurogentec (Seraing). Les plasmides préparés de manière « endofree » contiennent entre 0,02 et 0,11 EU/ μ g d'ADN. Par contre les plasmides préparés avec le kit « normal » ont un taux d'endotoxines nettement supérieur à 0,1 EU/ μ g (tableau III.5).

Nous avons ensuite voulu déterminer si l'élimination des endotoxines influence la transfection par les polymères ou le SuperFect.

Du plasmide « normal » et « endofree », complexé aux polymères NAPA C39b et SEMO B22 ou au SF, a été transfecté dans des cellules Cos-7. La figure III.7 présente ces résultats. Le taux de transfection est meilleur avec le plasmide « endofree » pour le SF et le polymère NAPA C39b. Le résultat inverse est

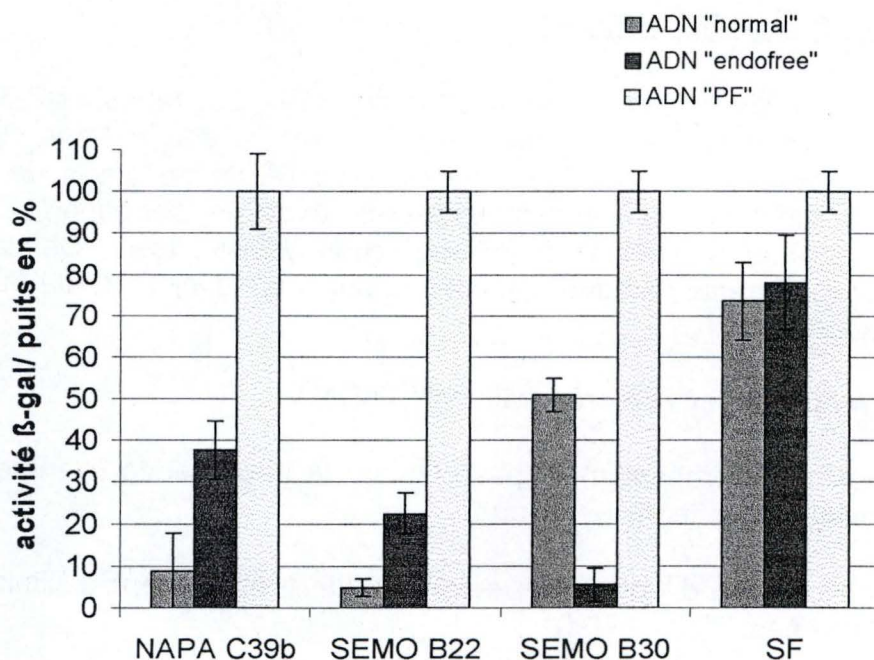


Figure III.8 : Influence de la qualité de l'ADN sur le taux de transfection. Des cellules Cos-7 sont transfectées avec les complexes SF/pCMV β , SEMO B22/pCMV β , NAPA C39b/pCMV β et SEMO B30/pCMV β préparés dans un rapport polymère/plasmide de 10/1. L'activité β -gal a été quantifiée après 24h par un test colorimétrique. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la réponse induite par l'ADN de PlasmidFactory portée à 100 (moyenne \pm DS de 3 déterminations).

Préparation d'ADN	Taux d'endotoxines (EU/ μ g d'ADN)
Expérience 1	
ADN PlasmidFactory	1,1
ADN "endofree"	0,32
ADN "normal"	2,41
Expérience 2	
ADN PlasmidFactory	1,09

Tableau III.6 : Tableau comparatif reprenant les taux d'endotoxines pour diverses préparations d'ADN. Les résultats sont exprimés comme la moyenne de 3 déterminations.

obtenu pour le polymère SEMO B22, néanmoins ce résultat n'a pas été reproduit dans d'autres manipulations (figure III.8).

A nouveau, pour cette expérience, il est correct de dire que les plasmides pCMV β « endofree » favorisent la transfection pour le SuperFect. Néanmoins, cette conclusion n'est plus vraie si on regarde la moyenne de toutes les manipulations réalisées par l'équipe :

- ADN endofree/SF : l'activité β -gal/puits est de $15,40 \pm 4,15$ (moyenne de 18 expériences indépendantes)
- ADN normal/SF : l'activité β -gal/puits est de $14,92 \pm 5,96$ (moyenne de 10 expériences indépendantes)

Etant donné les résultats obtenus, à savoir :

- l'amélioration du taux de transfection au sein d'une manipulation avec de l'ADN « endofree » comparé à de l'ADN « normal »,
- l'impossibilité de travailler *in vivo* avec de l'ADN contenant des endotoxines,
- la préparation des stocks limités d'ADN « endofree » engendre un facteur de variabilité supplémentaire,

l'équipe a demandé à la firme allemande PlasmidFactory (PF), une préparation d'ADN « endofree » suffisante pour travailler un an.

Nous avons comparé les 3 préparations d'ADN en transfection (ADN « normal », ADN « endofree » et ADN de PlasmidFactory) avec les polymères NAPA C39b, SEMO B22, SEMO B30 ainsi que le SF (figure III.8). L'ADN de PlasmidFactory donne de loin les meilleurs résultats pour tous les polycations utilisés. Cela confirme les tendances de l'expérience précédente (figure III.7).

Par acquis de conscience, nous avons vérifié le taux d'endotoxines présentes dans la préparation d'ADN de PlasmidFactory. A notre grande surprise, nous avons obtenu des valeurs bien supérieures à 0,1 EU/ μ g d'ADN (spécifications de la firme), alors que dans les mêmes conditions, un échantillon « endofree » préparé par nous, avec le kit décrit plus haut, donnait des valeurs nettement plus faibles (tableau III.6).

Nous avons recontacté la firme PlasmidFactory pour leur faire part de nos résultats inattendus. Ils ont refait un dosage et obtiennent des valeurs en dessous de 0,1 EU/ μ g. Néanmoins, ils sont prêts à collaborer avec nous pour comprendre où se situe le problème. Des contrôles et expériences sont en cours et chez PlasmidFactory et à l'URBC.

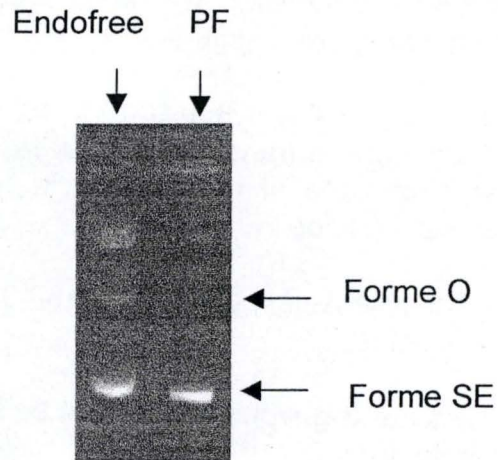


Figure III.9 : Séparation des formes superenroulées (SE) et circulaires ouvertes (O) par électrophorèse sur gel d'agarose. La piste 1 contient l'ADN endofree préparé avec le kit Qiagen au laboratoire. La piste 2 contient l'ADN de PlasmidFactory (PF).

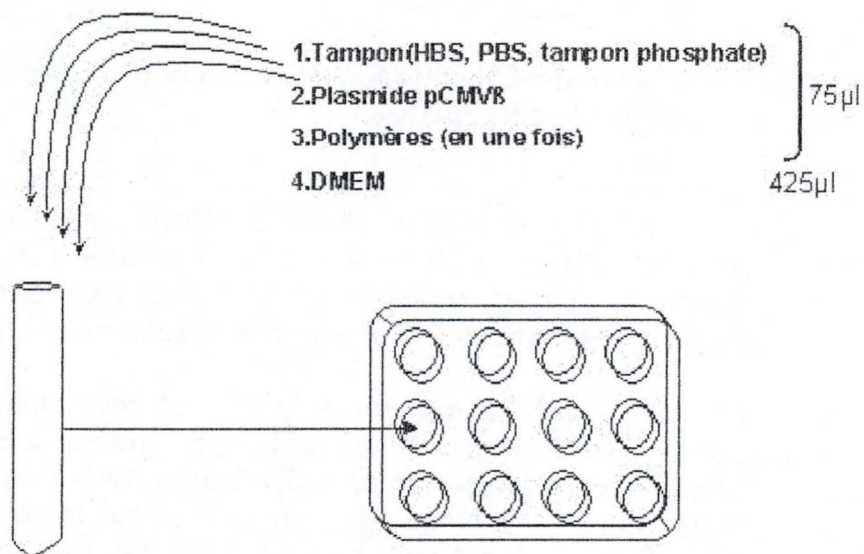


Figure III.10 : Schéma récapitulatif du protocole expérimental utilisé lors de la formation des complexes polymère/ADN.

III.2.3.2 Topologie de l'ADN : forme superenroulée et forme ouverte

Le taux d'endotoxines n'est pas la seule différence possible entre l'ADN de PlasmidFactory et le nôtre (« endofree » ou non « endofree »). Un plasmide peut exister sous différentes topologies : la forme superenroulée (SE) ou la forme circulaire ouverte (O).

Une séparation électrophorétique des différentes préparations de plasmides a été réalisée sur gel d'agarose. La forme superenroulée a tendance à migrer plus loin dans le gel que la forme ouverte. Les résultats sont présentés à la figure III.9. L'ADN de PlasmidFactory contient moins de forme ouverte que le nôtre.

Or des données de la littérature suggèrent que l'efficacité de transfection diminue quand l'ADN se trouve exclusivement sous la forme circulaire ouverte (Cherng et al, 1999). Ces données pourraient expliquer en partie les résultats illustrés à la figure III.8, qui montrent une meilleure transfection avec l'ADN de la firme PlasmidFactory.

III.2.4 Influence du mode de préparation des complexes sur le taux de transfection

Voici un bref rappel de la manière utilisée pour préparer les complexes : le plasmide est dilué dans du tampon. Ensuite, le polymère est ajouté (un petit volume d'une solution concentrée). Après une période d'incubation de 30 minutes, 425 µl de DMEM sont ajoutés aux complexes. Le tout est transféré sur les cellules. L'ensemble de la procédure est illustré à la figure III.10.

La manière d'ajouter les composés l'un à l'autre peut être un paramètre important auquel nous avons songé, étant donné les multiples méthodes décrites dans la littérature. Par exemple, dans le cas des complexes PEI/ADN, Boussif et ses collaborateurs ont montré que l'addition de PEI goutte à goutte à la solution d'ADN, conduit à la formation de polyplexes ayant une activité transfectante 10 fois supérieure à celle de complexes obtenus par l'addition d'ADN au PEI ou par l'addition rapide de PEI à l'ADN (Kircheis et al, 2001).

Nous avons donc essayé les protocoles suivants :

- I. La première possibilité consiste à ajouter le polymère (solution concentrée) en une seule fois, à la solution de tampon contenant l'ADN.
- II. La deuxième possibilité consiste à ajouter le polymère (solution diluée), goutte à goutte à la solution de tampon avec l'ADN.
- III. La troisième méthode correspond à la deuxième mais la suspension tampon/ADN/polymère est vortexée avant l'incubation de 30 minutes.

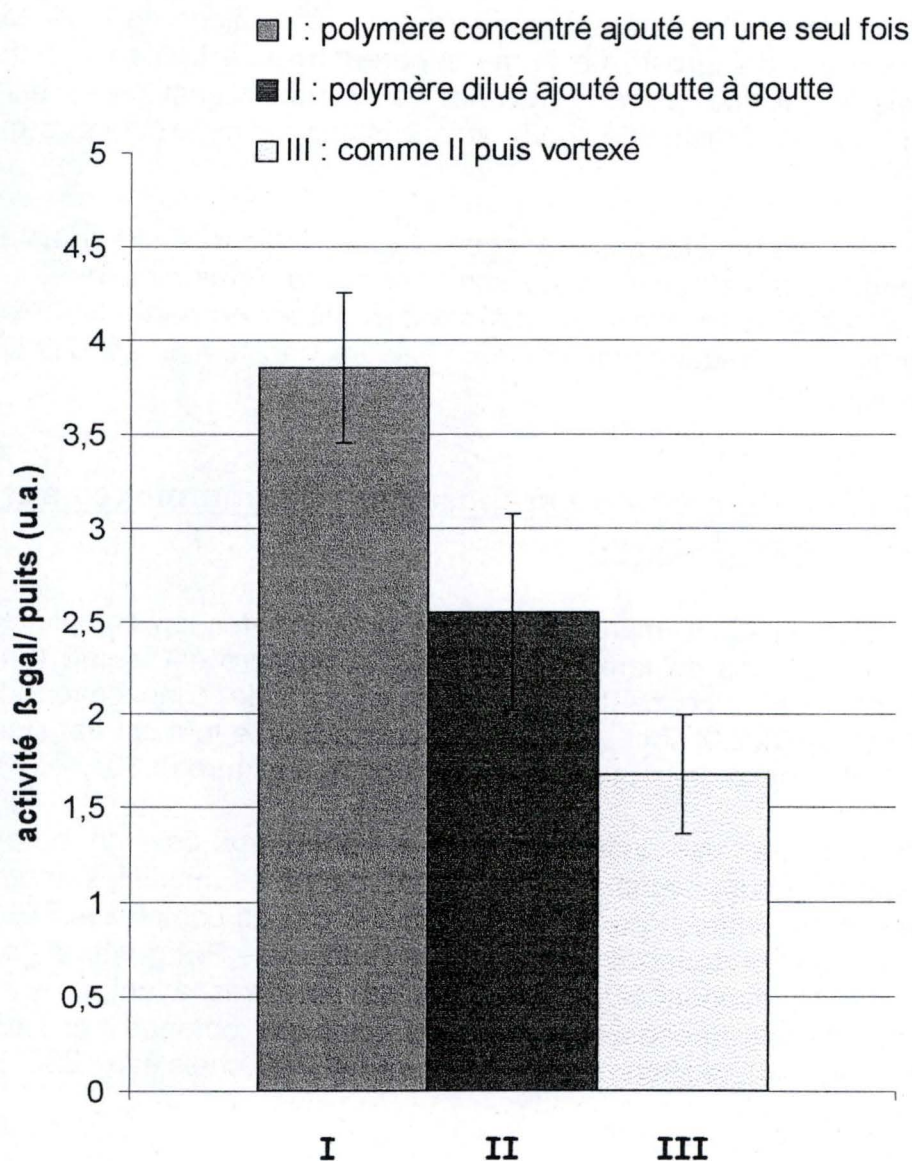


Figure III.11 : Influence du mode de préparation des complexes sur le taux de transfection. Des cellules Cos-7 sont transfectées avec les complexes SEMO B22/pCMV β . L'activité β -gal a été quantifiée après 24h par un test colorimétrique. Les résultats sont exprimés comme la moyenne \pm DS de 3 déterminations. Dans le cas du protocole I, le polymère concentré est ajouté en une seule fois à la solution d'ADN/tampon. Dans le protocole II, le polymère dilué est ajouté goutte à goutte et dans le protocole III, le polymère dilué est ajouté goutte à goutte et la suspension est vortexée.

Ces méthodes ont été testées en transfection avec les complexes SEMO B22/pCMV β . Les résultats sont présentés à la figure III.11. La première méthode donne les meilleurs taux de transfection. C'est celle que nous utilisons depuis le début pour toutes les transfusions. Vortexer les complexes est à proscrire, car cela diminue de plus de la moitié le taux de transfection.

III.2.5 En résumé

Dans cette partie du mémoire, 4 paramètres de transfection ont été analysés. A savoir :

- **le rapport polymère/ADN :**

Nous avons constaté que ce rapport influence fortement le taux de transfection. Le rapport optimum dépend également du Mn du polymère, donc de la longueur de la chaîne de poly(MADAM) et donc du nombre de charges positives. En effet, pour les polymères de Mn élevé, nous devons ajouter moins de polymères pour former les complexes que s'ils ont un plus petit Mn.

- **le tampon de complexation :**

Nous avons comparé, l'influence de trois tampons de complexations (HBS, PBS et le tampon phosphate) sur la transfection des cellules Cos-7. Au sein d'une manipulation, le tampon HBS semble être un tampon plus adéquat que le PBS ou le tampon phosphate. Par contre, si nous regardons les activités β -gal moyennes sur l'ensemble des expériences réalisées dans les trois conditions, cette conclusion est moins évidente.

Nous avons pris la décision de continuer à tester les polymères *in vitro* dans le tampon HBS pour être dans les conditions optimales de transfection. Dans la suite du projet, lorsque l'équipe travaillera *in vivo*, les complexes seront formés dans le PBS étant donné que nous ne pouvons pas injecter de l'HBS dans l'organisme.

- **la qualité de l'ADN :**

Après avoir testé en transfection notre ADN préparé dans des conditions « endofree » (ADN pauvre en endotoxines) et notre ADN « normal », nous avons constaté que les taux de transfection étaient meilleurs au sein d'une manipulation avec l'ADN « endofree ». Si nous regardons les activités β -gal moyennes sur l'ensemble des expériences réalisées dans les deux conditions, de nouveau, cette conclusion est moins évidente.

Nous avons également testé en transfection de l'ADN « endofree » fourni par PlasmidFactory. Le problème des endotoxines reste ouvert. D'autre part, cet ADN est plus riche en forme superenroulée que nos

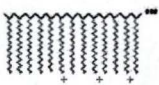
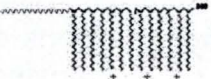
Type		Nom	Polymérisation		Mn (Da)	D
			Conv.	ATRP		
Poly(MADAM)		MIWA A9		x	19 700	1,15
		MIWA A23		x	26 400	1,17
		MIWA A25		x	37 500	1,18
Poly(MADAM) avec amorce PEO		MIWA A33		x	18 900	1,23
		SEMO B30		x	24 000	1,23
		MIWA A35		x	30 800	1,3

Tableau III.7 : Tableau récapitulatif des différents polymères poly(MADAM) utilisés, avec ou sans amorce PEO.

préparations d'ADN et donne des résultats nettement supérieurs en transfection.

En conclusion, la qualité de l'ADN a une très grande influence sur le taux de transfection. La suite du travail a été réalisée avec l'ADN fourni par PlasmidFactory.

- **le mode de préparation des complexes :**

Après avoir comparé trois modes de préparation des complexes en transfection avec nos polymères, nous avons remarqué l'importance de ce paramètre. Ajouter le polymère concentré en une seule fois à la solution de tampon/ADN semble être la méthode la plus efficace. C'est celle que nous utilisons depuis le début pour toutes les transfusions. Vortexer les complexes est à proscrire, car cela diminue clairement le taux de transfection.

Après avoir pointé une série de paramètres critiques pour l'efficacité de transfection, en ne travaillant que sur un nombre limité de polymères (tableau III.2), nous allons maintenant aborder la deuxième partie de ce travail, à savoir l'étude de l'influence de la structure des polymères sur l'efficacité de transfection.

III.3 Influence de la structure des polymères sur le taux de transfection

Comme nous l'avons déjà signalé dans le paragraphe consacré à la caractérisation des polymères, nous nous sommes focalisés sur 2 structures différentes de polymères: des homopolymères contenant uniquement des chaînes de poly(MADAM) et des co-polymères contenant une amorce de PEO de 10 unités de polyoxyde d'éthylène sur laquelle est greffée une chaîne de poly(MADAM) de longueur variable. Le segment PEO se positionne donc dans le prolongement de la dorsale de méthacrylate (figure III.3). Ces différents polymères sont récapitulés dans le tableau III.7.

III.3.1 Influence de la longueur de la chaîne de poly(MADAM) sur le taux de transfection

Nous nous sommes intéressés à l'influence de la longueur de la chaîne d'homopolymère de MADAM sur le taux de transfection.

Nous avons reçu trois polymères poly(MADAM) (le MIWA A9, le MIWA A23 et le MIWA A25) présentés dans le tableau III.7. Les M_n varient entre $\pm 19\ 000$ et $37\ 000$ Da. Ils sont tous les trois synthétisés par la méthode ATRP qui réduit la polydispersité au niveau de la synthèse.

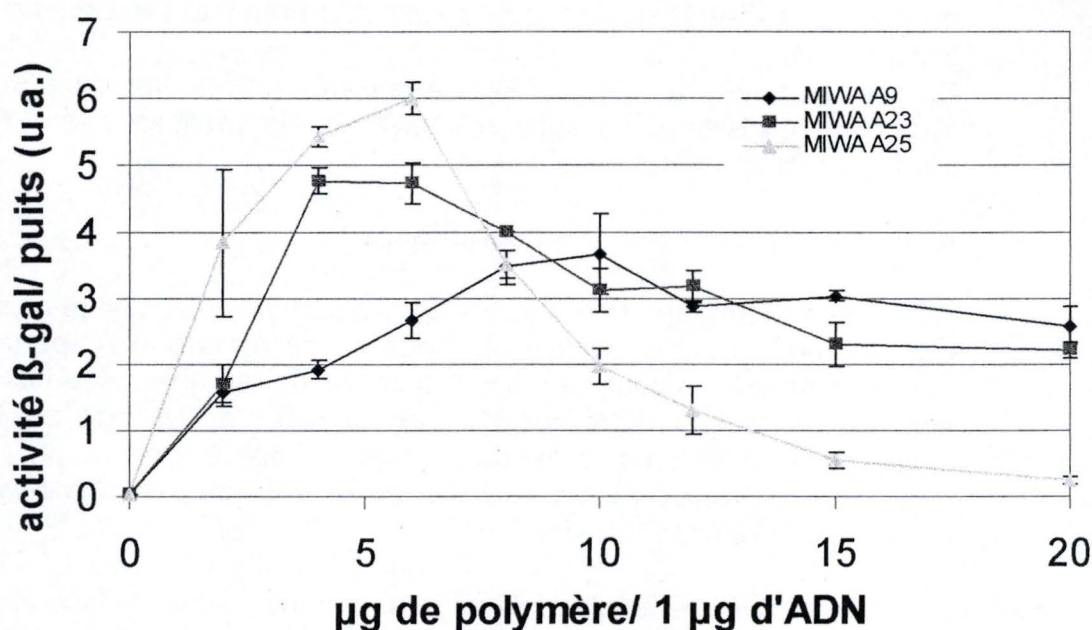


Figure III.12 : Influence du Mn du Poly(MADAM) sur le taux de transfection. Des cellules Cos-7 sont transfectées avec les complexes MIWA A9/pCMV β , MIWA A23/pCMV β et MIWA A25/pCMV β , formés avec des rapports polymère/ADN allant de 1/1 à 20/1. L'activité β -gal a été quantifiée après 24h par un test colorimétrique. Les résultats sont exprimés comme la moyenne \pm l'écartype de deux déterminations.

Rapport polymère/ADN \rightarrow Polymère \downarrow	Mortalité cellulaire (%)						n \downarrow
	2/1	4/1	6/1	8/1	10/1	12/1	
MIWA A 9				12,7	10,5	18,1	1
MIWA A23		2,0	8,4	10,8	11,0		3
MIWA A25	0	6,7	12,6				2
SF			36,3				4

Tableau III.8 Mortalité estimée après dosage des protéines par la méthode de Folin pour les complexes MIWA A9/pCMV β , MIWA A23/pCMV β , MIWA A25/pCMV β et SF/pCMV β (dans les rapports où la transfection est efficace). n représente le nombre de dosages indépendants effectués. Chaque dosage est réalisé en duplicats. Les résultats sont exprimés comme le pourcentage moyen de mortalité par rapport aux cellules non transfectées.

Ces trois polymères ont été testés en transfection sur des cellules Cos-7. Les résultats obtenus en colorimétrie sont présentés à la figure III.12. Pour le polymère MIWA A25, qui est le polymère ayant le Mn le plus élevé, les meilleurs taux de transfection sont obtenus aux rapports 2/1, 4/1 et 6/1. Le polymère MIWA A9 est le polymère ayant le Mn le plus moins élevé. Celui-ci est le plus efficace aux rapports allant de 8/1 à 15/1. Enfin, le polymère MIWA A23 est le polymère possédant le Mn intermédiaire. Les rapports donnant une efficacité de transfection maximale sont 4/1, 6/1 et 8/1. Nous observons la tendance déjà présentée avec les polymères NAPA C18 et NAPA C39b : plus le Mn du polymère est élevé, moins il faut de μg de polymère pour atteindre le taux de transfection maximal.

Nous nous sommes également intéressés à la toxicité de ces complexes vis-à-vis des cellules. Le dosage de protéines 24 heures après la transfection est la méthode utilisée à cet effet. Les cellules mortes se détachent de leur support et sont éliminées par les rinçages. Donc si le taux de protéines diminue dans le puits, cela signifie que ces complexes sont toxiques pour les cellules.

Ces résultats sont présentés dans le tableau III.8. Les complexes polymère/pCMV β provoquent entre 0 et 18,1% de mortalité cellulaire dans la gamme de rapports où la transfection est efficace (plus le rapport polymère/ADN est élevé, plus le taux de mortalité cellulaire augmente).

Van de Wetering et collaborateurs ont également réalisé des études de toxicité de polymères poly(MADAM). Ils travaillent avec des chaînes nettement plus longues (Mn de l'ordre de 500 Da). Pour un rapport polym/ADN de 2/1, ce qui correspond au rapport donnant la meilleure transfection de cellules OVCAR-3, ils observent entre 50 et 60% de mortalité (van de Wetering et al, 1999). Ces résultats appuient l'hypothèse d'une meilleure biocompatibilité des polymères à chaînes courtes.

Il faut remarquer que le SF est plus toxique que les polymères car il provoque en moyenne 36.3% de mortalité cellulaire. Or le SF transfecte plus efficacement les cellules. Nous devons donc trouver un compromis : rechercher les conditions qui donneront un taux de transfection suffisant tout en provoquant une mortalité cellulaire acceptable.

III.3.2 Influence d'une amorce PEO sur le taux de transfection

Nous avons également étudié l'effet de polymères poly(MADAM) avec une amorce PEO afin de voir si :

- ces polymères transfectent les cellules Cos-7 (car l'ajout d'une amorce PEO pourrait empêcher la transfection des cellules),
- l'amorce de PEO diminue la toxicité des complexes vis-à-vis des cellules par rapport aux complexes poly(MADAM)/ADN sans PEO,

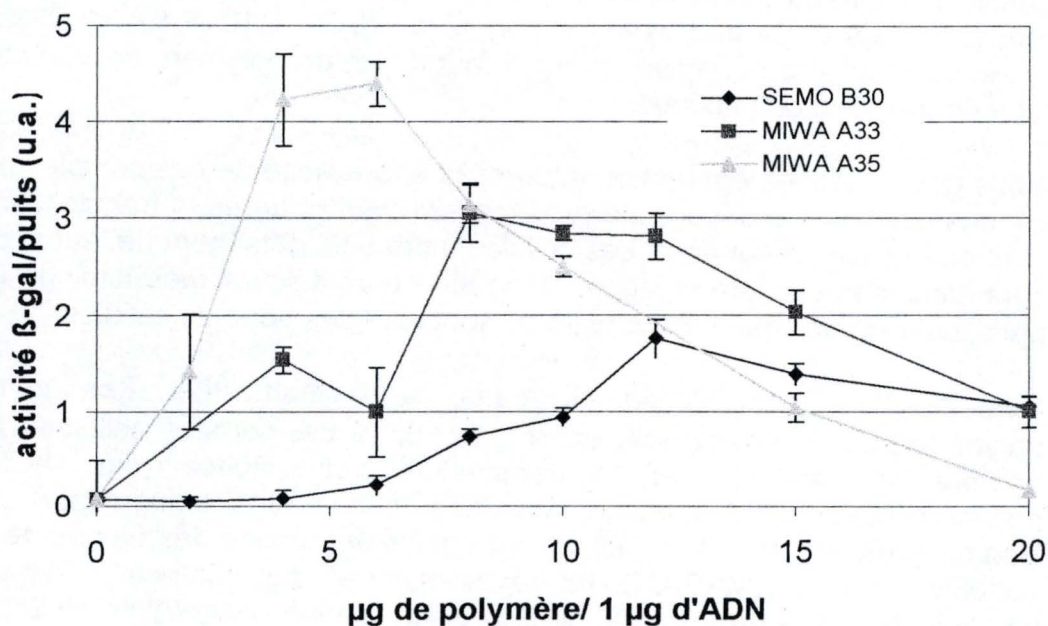


Figure III.13 : Influence de la longueur de la chaîne de Poly(MADAM) sur le taux de transfection. Des cellules Cos-7 sont transfectées avec les complexes MIWA A33/pCMV β , SEMO B30/pCMV β et MIWA A35/pCMV β formés dans de l'HBS aux rapports polymère/ADN allant de 1/1 à 20/1. L'activité β -gal a été quantifiée après 24h par un test colorimétrique. Les résultats sont exprimés comme la moyenne \pm l'écartype de deux déterminations

- l'amorce de PEO joue son rôle de protection, empêchant l'interaction des protéines du sérum avec les complexes par comparaison avec les complexes poly(MADAM)/ADN sans PEO.

Trois polymères de ce type ont été testés : le MIWA A33, le SEMO B30 et le MIWA A35. Leurs caractéristiques sont reprises dans le tableau III.7.

La première question que nous nous sommes posée était de voir si ces polymères, complexés à de l'ADN, transfectent les cellules Cos-7 (figure III.13). Une activité β -gal de 4,5 unités arbitraires a été observée pour le MIWA A35. Comme attendu, les complexes MIWA A35/pCMV β , correspondant au polymère ayant le Mn le plus élevé, ont une efficacité transfection maximale à des rapports polymère/ADN relativement faibles. Comme précédemment, les courbes obtenues pour les polymères de taille plus petite sont déplacées vers la droite. Cependant, le profil de la courbe change d'une manipulation à l'autre pour le polymère SEMO B30 : nous avons en effet d'énormes problèmes de reproductibilité avec ce polymère (figure III.14B). C'est moins le cas pour les 2 autres polymères (figures III.14A et 14C).

Nous avons également étudié la toxicité de ces complexes vis-à-vis des cellules (tableau III.9). Ils provoquent entre 0 et 14,9% de mortalité cellulaire dans la gamme de rapports où la transfection est efficace. Il est intéressant de comparer les pourcentages de mortalité cellulaire du MIWA A25 (sans PEO) avec ceux du MIWA A35 (avec PEO). Ils ont plus ou moins le même Mn et ne diffèrent que par la présence ou non de l'amorce PEO. Les complexes MIWA A35/pCMV β provoquent entre 1 et 6,8% de mortalité cellulaire, alors que les complexes MIWA A25/pCMV β en provoquent entre 0 et 12,6% (comparaison des tableaux III.8 et III.9). La même comparaison peut être faite entre les polymères MIWA A9 et MIWA A33. Les puits complexes MIWA A33/pCMV β présentent entre 0 et 5,6% de mortalité cellulaire alors que les complexes MIWA A9/pCMV β en induisent entre 10,5 et 18,1% (comparaison des tables III.8 et III.9). La comparaison entre les polymères MIWA A23 et SEMO B30 est plus difficile car ils ne sont pas efficaces en transfection dans la même gamme de rapports. En conclusion, nous pouvons dire que le PEO réduit légèrement la toxicité des polymères vis-à-vis des cellules.

Un deuxième avantage recherché par l'ajout des chaînes de PEO est d'éviter l'opsonisation des complexes, qui provoque leur élimination de l'organisme (Cf. Introduction, paragraphe I.3.1). Un moyen de voir si le PEO remplit effectivement ce rôle, c'est d'ajouter du sérum (FBS) pendant la période de transfection. Le sérum contient des protéines susceptibles d'adsorber les complexes (par exemple l'albumine).

Nous avons transfecté des cellules Cos-7 avec des complexes MIWA A25/pCMV β (sans PEO) et MIWA A35/pCMV β (avec PEO) en ajoutant de 2% à 5% de FBS pendant l'incubation des complexes avec les cellules. La préparation des complexes se fait toujours en absence de sérum. Les résultats obtenus en colorimétrie sont présentés à la figure III.15.

Les complexes MIWA A25/pCMV β sont peu affectés par la présence de sérum dans les rapports de masse polymère/ADN les plus élevés (4/1 et 6/1) contrairement aux complexes MIWA A35/pCMV β contenant du PEO. Ces résultats vont quelque peu à l'encontre de ce qu'on attendait. La même

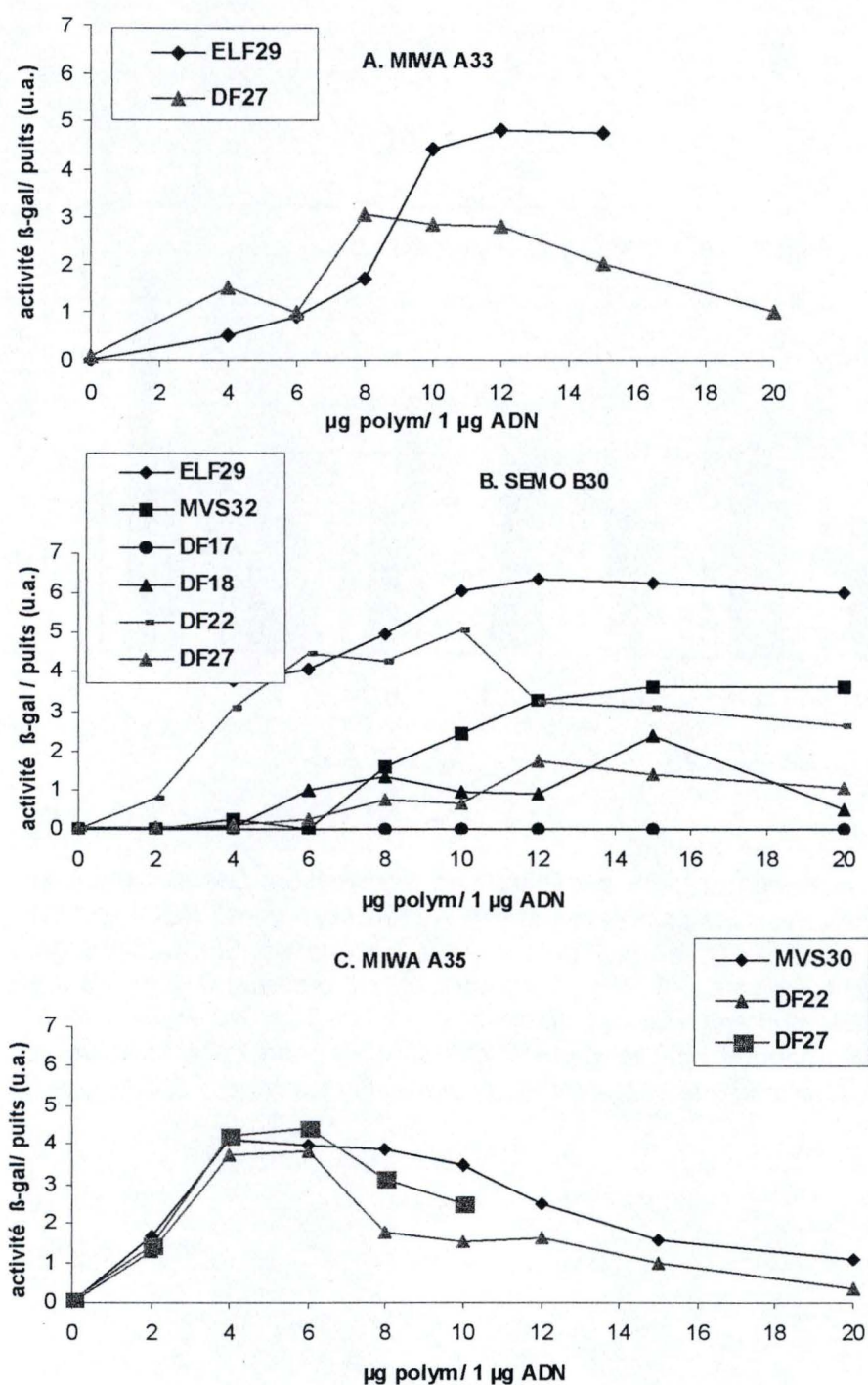


Figure III.14 : Récapitulation de toutes les expériences de transfection réalisées avec les polymères de poly(MADAM) avec amorce PEO : MIWA A33 (A), SEMO B30 (B) et MIWA A35 (C). Les résultats sont exprimés en unités d'activité β -gal par puits, pour les différents rapports polymère/ADN testés. Chaque courbe représente une expérience indépendante. Par souci de clarté, seule la moyenne est donnée. Les erreurs sont inférieures ou égales à 10%. Nous avons rassemblé les résultats obtenus par les différents chercheurs de l'équipe polyplex.

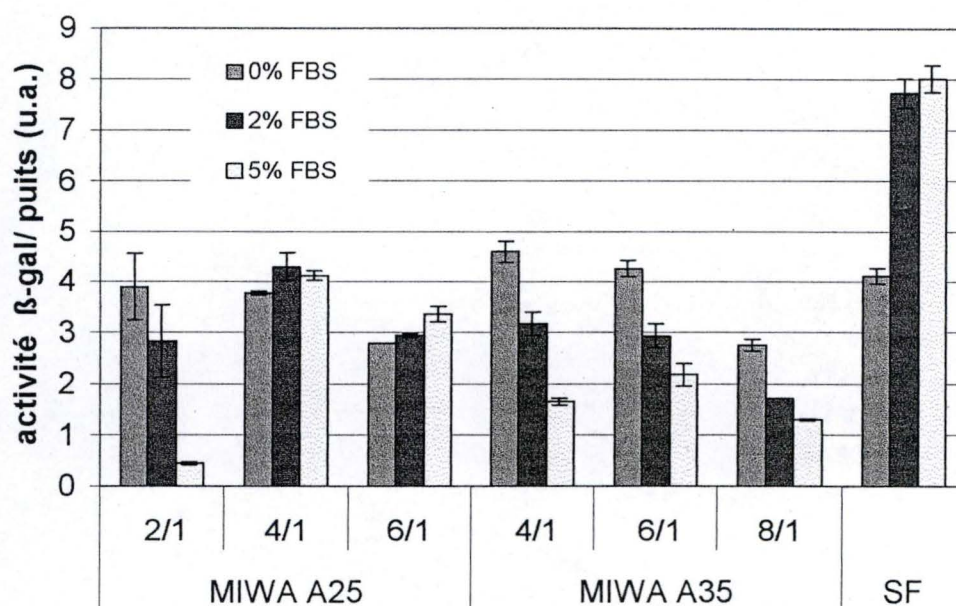


Figure III.15 : Influence du FBS sur le taux de transfection. Les cellules Cos-7 sont transfectées avec les complexes MIWA A25/pCMV β (sans PEO) et MIWA /A35 pCMV β (avec PEO) , ainsi qu'avec des complexes SF/ pCMV β dans différents rapports polymère/ADN (2/1, 4/1, 6/1, 8/1). Du sérum 0, 2 et 5% a été ajouté au DMEM contenant les complexes après les 30 minutes d'incubation polymère/ADN/tampon. L'activité β -gal a été quantifié après 24h par un test colorimétrique. Les résultats sont exprimés comme la moyenne \pm l'écart type de 2 déterminations.

conclusion peut être émise pour les polymères MIWA A23 (sans PEO) et SEMO B30 (avec amorce PEO de 10) (données non montrées).

Dans cette expérience, le SuperFect donne de meilleurs taux de transfection lorsque du FBS est présent. Néanmoins, pour trois autres expériences réalisées dans les mêmes conditions, l'activité β -gal est comparable qu'il y ait ou non du sérum (données non présentées). La présence de sérum ne semble donc pas influencer le taux de transfection pour le SuperFect.

III.3.3 Conclusions

Si on considère les polymères poly(MADAM) sans amorce PEO, nous constatons avec les 3 polymères testés, que plus la taille du polymère augmente, plus les rapports correspondant à la transfection maximale, sont faibles :

- entre 4/1 et 6/1 pour le polymère MIWA A25 (Mn de 37 500 Da) et
- entre 8/1 et 12/1 pour le polymère MIWA A9 (Mn de 19 700 Da).

Il y a donc un glissement des courbes. En outre, avec le polymère MIWA A25, nous obtenons des taux corrects de transfection et ce de manière plus reproductible, ce qui se reflète par une activité β -gal par puits comprise entre 4 et 6 unités arbitraires.

Après avoir transfecté des cellules Cos-7 avec trois poly(MADAM) comportant une amorce PEO, nous avons constaté que ces polymères ont toujours la capacité de transfecter les cellules. Ce n'était pas le cas des polymères contenant des éléments PEO insérés aléatoirement dans la dorsale de méthacrylate : ces polymères avaient déjà été testés au laboratoire avant le début de ce travail et aucune activité β -gal n'avait pu être détectée dans les cellules Cos-7 après transfection. Pour expliquer ce problème, une hypothèse a été émise : les chaînes de PEO engloberaient tellement le polymère, qu'il ne reste plus assez de charges positives disponibles pour interagir avec l'ADN afin de former des complexes. Cette interaction PEO/poly(MADAM) serait très marquée pour les polymères statistiques.

Nous avons comparé la toxicité des polymères poly(MADAM) et des polymères poly(MADAM) avec une amorce PEO. Nous avons constaté que les amorces de PEO réduisent un peu la toxicité vis-à-vis des cellules.

Nous avons transfecté des cellules Cos-7 avec des complexes sans PEO et avec PEO en ajoutant du sérum (2% ou 5%) pendant l'incubation des complexes avec les cellules. Les complexes sans PEO sont peu affectés par la présence de sérum contrairement aux complexes contenant du PEO. Le PEO sous forme d'une amorce de 10 éléments n'améliore donc pas la transfection en présence de sérum.

Les expériences réalisées ici sont encore trop préliminaires pour tirer des conclusions définitives. Cependant, l'équipe du SMPC a déjà fait des propositions de synthèses pour de nouveaux co-polymères poly(MADAM-MAPEO) (voir paragraphe perspectives).

III.4 Caractérisation intracellulaire du cheminement des complexes

III.4.1 Résultats

Dans ce dernier point, nous allons aborder la partie plus fondamentale du mémoire, qui a pour objectif de comprendre pourquoi les polymères transfectent moins efficacement que le SuperFect. Nous allons étudier, par microscopie confocale, le cheminement intracellulaire des complexes polymères/ADN et SuperFect/ADN avec de l'ADN rendu fluorescent.

Les conditions de transfection pour l'analyse confocale sont légèrement différentes des conditions décrites précédemment pour la révélation de l'activité β -galactosidase. Dans ce cas, les cellules sont cultivées sur couvre-objet en verre et l'ADN est préalablement marqué avant d'être transfecté dans les cellules.

L'équipe a testé, avant le commencement de ce mémoire, une technique de marquage des complexes. La méthode consistait à transfecter les cellules avec de l'ADN biotinylé. Des anticorps anti-biotine couplés à un fluorochrome sont par la suite dirigés contre cet ADN biotinylé. Les complexes sont détectables au microscope confocal dans le cas des complexes SF/pCMV β , mais rien n'est observé pour les complexes polymère/pCMV β .

Nous avons essayé de comprendre le problème. Comme expliqué dans l'introduction, le SF et les poly(MADAM) ont une structure totalement différente. L'ADN est enroulé autour du SF alors que l'ADN se trouve probablement pelotonné à l'intérieur du polymère. Si c'est le cas, pour ces derniers, l'ADN biotinylé n'est pas accessible aux anticorps anti-biotine. Il faut donc chercher une autre technique qui fonctionne dans les 2 cas.

Nous avons pensé à marquer l'ADN avec des molécules de YOYO-1. Cette molécule devient fluorescente lorsqu'elle s'intercale entre les bases de l'ADN. Cette méthode a été utilisée avec succès pour suivre l'endocytose de complexes de transfection dans d'autres types cellulaires (cellules K562, fibroblastes L929 ou cellules EA.hy 926 (endothéliales)), par cytométrie de flux ou microscopie confocale (Rémy-Kristensen et al, 2001 ; Ogris et al 2000).

Les résultats présentés ci-dessous ont été obtenus par cette technique.

Nous avons transfecté des cellules Cos-7,ensemencées la veille sur les couvre-objets à raison de 20 000 cellules par lamelle, avec les complexes polymères MIWA A35/ pCMV β -YOYO-1 et SF/ pCMV β -YOYO-1.

Nous avons réalisé une cinétique d'incorporation des complexes : les cellules ont été fixées de demi heure en demi heure jusqu'au temps 4 heures.

Les endosomes ont ensuite été marqués avec les anticorps primaires et secondaires et l'ADN endogène avec le TOPRO. Les cellules ont été observées au microscope confocal après avoir monté les lames couvre-objets au mowiol (Matériels et méthodes point II.8).

L'ADN plasmidique est visualisé grâce aux molécules de YOYO-1 (agent intercalant) émettant dans le vert. Les noyaux sont repérés par un marquage de l'ADN endogène au TOPRO-3 (agent intercalant révélé en bleu). Les endosomes, quant à eux, sont repérés grâce aux anticorps couplés à un fluorochrome (Alexa 568, excité à une longueur d'onde de 568 nm et émettant dans le rouge).

De manière générale, les complexes SF/ADN sont beaucoup plus petits que les complexes polymères MIWA A35/ADN (quelques μm). Au temps $t = 30$ minutes de la cinétique, dans un cas comme dans l'autre, la majorité des complexes est détectable autour de la cellule et quelques uns sont déjà observés à l'intérieur de la cellule.

De 30 minutes à 4 h, une augmentation progressive du nombre de complexes dans les cellules est visible et la taille des complexes vecteur/ADN augmente également : cela signifie donc qu'il y a une agrégation des complexes au cours du temps, mais les cellules restent capables de les ingérer.

A 4 heures, il est possible de détecter des complexes dans le noyau, cependant cela reste un évènement rare. Un grand avantage du système confocal est de pouvoir prendre des images à différents plans dans l'épaisseur de la cellule. Par exemple pour la figure III.16, l'épaisseur de la cellule a été fragmentée en une 20^{aine} de coupes optiques de 0,2 μm chacune et nous avons choisi les coupes 3, 5, 8, 12 et 15 pour réaliser le montage. Ceci nous permet de déterminer sans ambiguïté si le complexe est bien présent à l'intérieur du noyau. Nous avons visualisé le transgène marqué au YOYO-1 dans le noyau, dans le cas où les cellules étaient transfectées (4 heures d'incubation des complexes sur les cellules avant fixation) avec les complexes SuperFect/ADN (figure III.16).

Afin de mieux comprendre le cheminement des complexes de la membrane plasmique vers le noyau, nous avons marqué les endosomes précoces et tardifs, pour voir si les complexes passent par la voie d'endocytose. Dans ce but nous avons choisi deux antigènes :

- **EEA1** pour les endosomes précoces : EEA1 (Early Endosome Antigen 1) est une protéine périphérique hydrophile de la membrane des endosomes précoces (Mu et al, 1995).

- **Rab-7** pour les endosomes tardifs : Rab7 fait partie d'une famille de petites protéines G (Rab4, Rab5, Rab7, Rab9...) qui s'associent aux membranes endosomales et régulent le trafic endosomal. Rab4 et Rab5 sont localisées au niveau des endosomes précoces, Rab7 et Rab9, au niveau des endosomes tardifs (Mu et al, 1995).

Dans un premier temps, des lamelles couvre-objet contrôles, ont été réalisées pour marquer les protéines EEA1 et Rab-7 séparément dans des cellules Cos-7 non transfectées (figure III.17). Le marquage de EEA1 est très différent du marquage de Rab-7. Pour ce dernier, nous observons un réseau dans toute la cellule, contrairement au marquage EEA1 qui se localise plus près du noyau.

Par la suite, des cellules Cos-7 ont été transfectées par les complexes SF/ADN-YOYO-1 et MIWA A35/ADN-YOYO-1. Les cellules sont fixées de 30 en 30 minutes après l'ajout des complexes, pour étudier de manière fine la cinétique d'internalisation de ces complexes. Seuls les temps 30 minutes et 4 heures ont été sélectionnés pour illustrer les résultats obtenus.

Nous pouvons affirmer avec certitude que les complexes polymères MIWA A35/ADN sont internalisés dans des vésicules « endosome-like » marquées par des anticorps anti-EEA1 du temps 30 minutes jusqu'au temps 1h30 de la cinétique (figure III.18). Pour ces temps, la majorité des complexes polymères MIWA A35/ADN, présents dans toute la cellule, est entourée par ce marquage. Du temps 2h jusqu'au temps 4h, les complexes sont toujours observés partout dans la cellule, mais ne sont plus entourés par ce marquage.

La colocalisation des marquages EEA1/YOYO-1 est illustrée de manière encore plus convaincante dans la figure III.19. Les images obtenues pour les 2 canaux rouge et vert sont séparées ou superposées (overlay). Nous voyons nettement que le marquage anti-EEA1 entoure les complexes marqués au YOYO-1, et ce malgré leur grande taille.

Pour le marquage de Rab-7, nous détectons des complexes associés à des structures marquées par des anticorps anti-Rab7 dès le temps 30 minutes. Ces colocalisations augmentent au cours du temps (figure III.18), mais dans le cas de Rab7, le marquage n'entoure jamais complètement le complexe comme dans le cas des anticorps EEA1.

En conclusion, les complexes polymères MIWA A35/ADN semblent entrer dans les cellules par la voie d'endocytose en passant par des vésicules « endosomes-like » associées à EEA1 puis Rab-7. La taille de ces vésicules est surprenante et de loin supérieure à celle décrite pour l'endosome.

Dans le cas des complexes SF/ADN, les images diffèrent quelque peu. Nous n'observons pas de colocalisation entre les complexes et le marquage anti-EEA1 lors de la cinétique (figure III.18). Ceci pourrait s'expliquer par une entrée très rapide des complexes SF/ADN dans la cellule et qu'à 30 minutes, ces complexes soient déjà sortis des endosomes précoces. Néanmoins, à partir du temps 2h et jusqu'à 4h le marquage anti-Rab7 semble accompagner certains complexes, ce qui est assez difficile à expliquer.

SuperFect : Incubation 4 heures

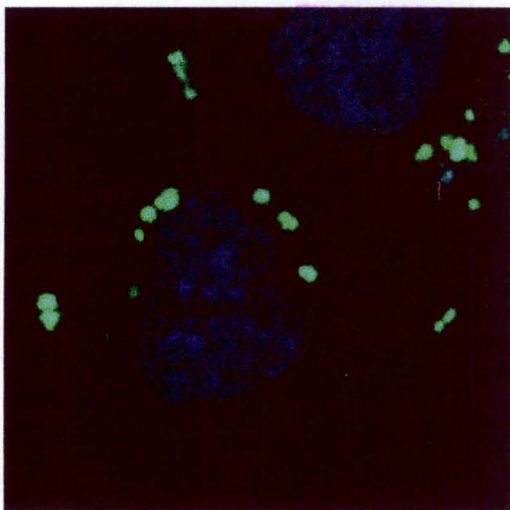
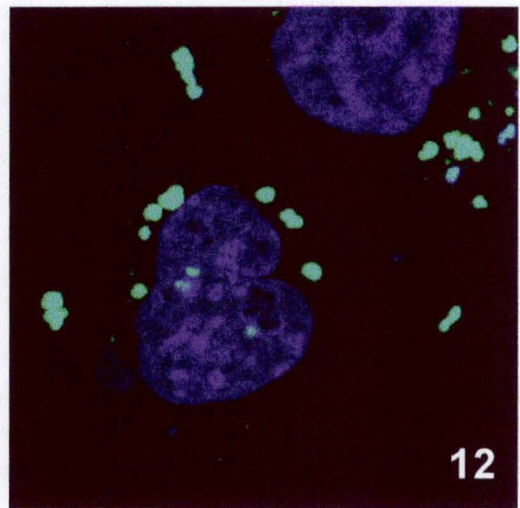
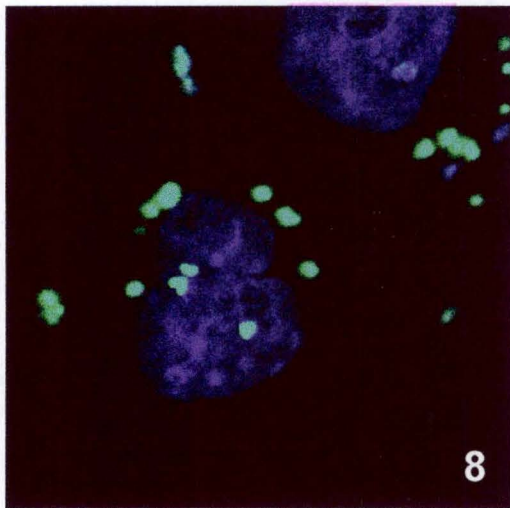
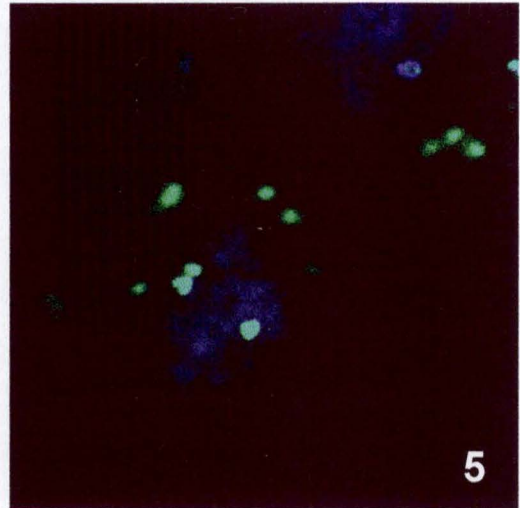
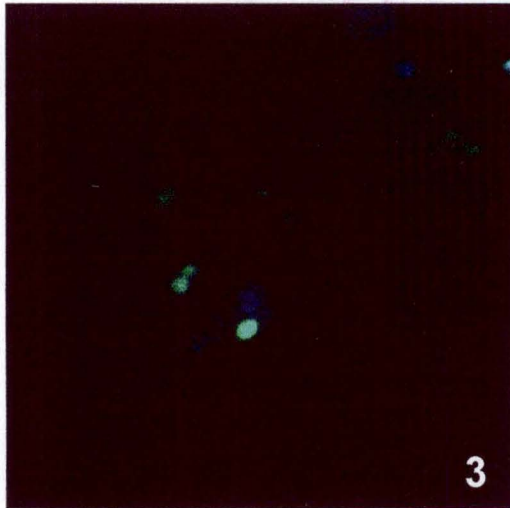
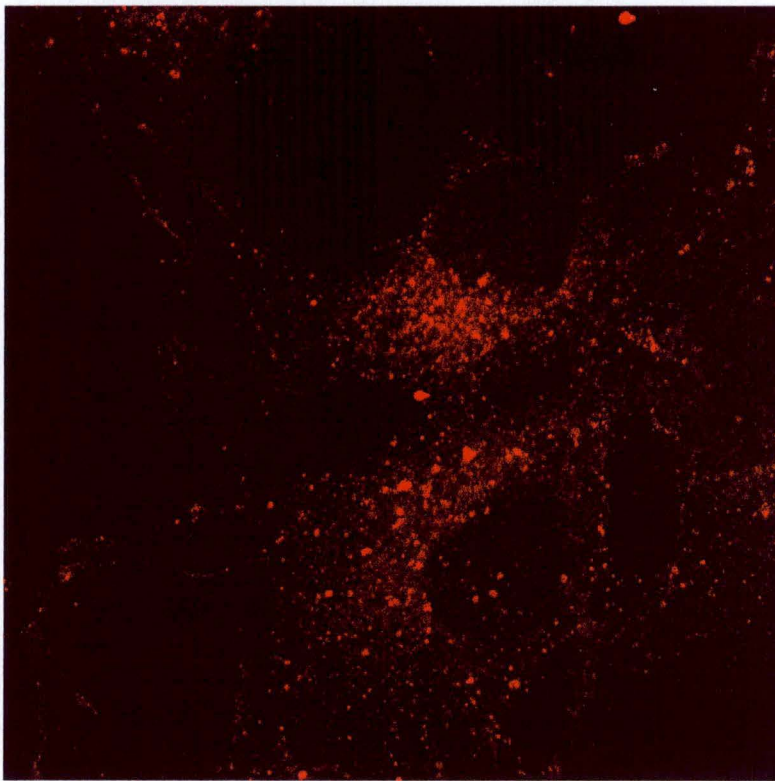
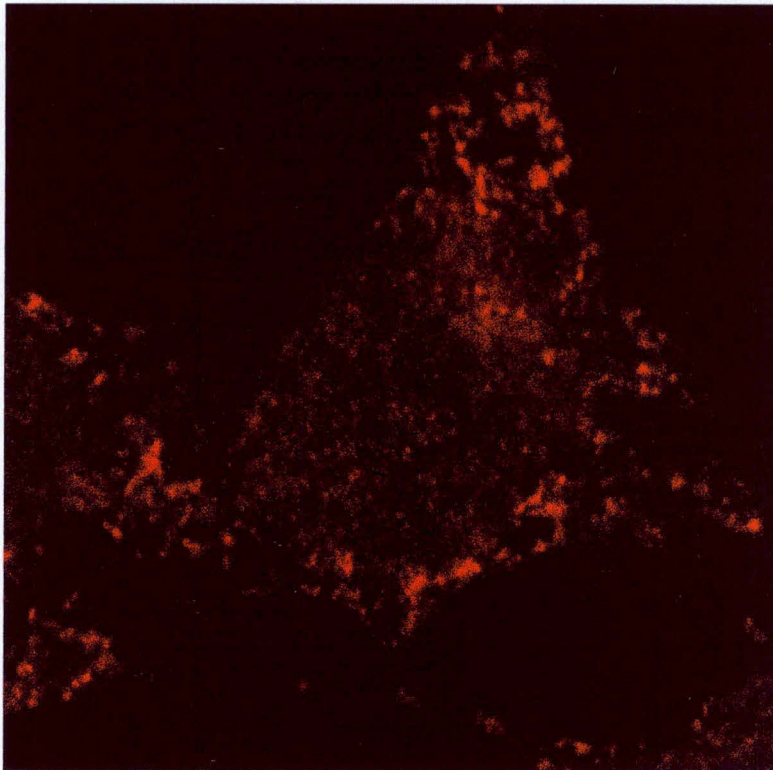


Figure III.16 : Galerie partielle obtenue en microscopie confocale de cellules Cos-7 transfectées par les complexes SF/pCMV β -YOYO-1. Parmi la 20^{aine} de coupes réalisées, seules les coupes 3,5,8,12 et 15 ont été utilisées. En vert : l'ADN plasmidique. En bleu : l'ADN endogène.

Marquage contrôle EEA1 et Rab-7



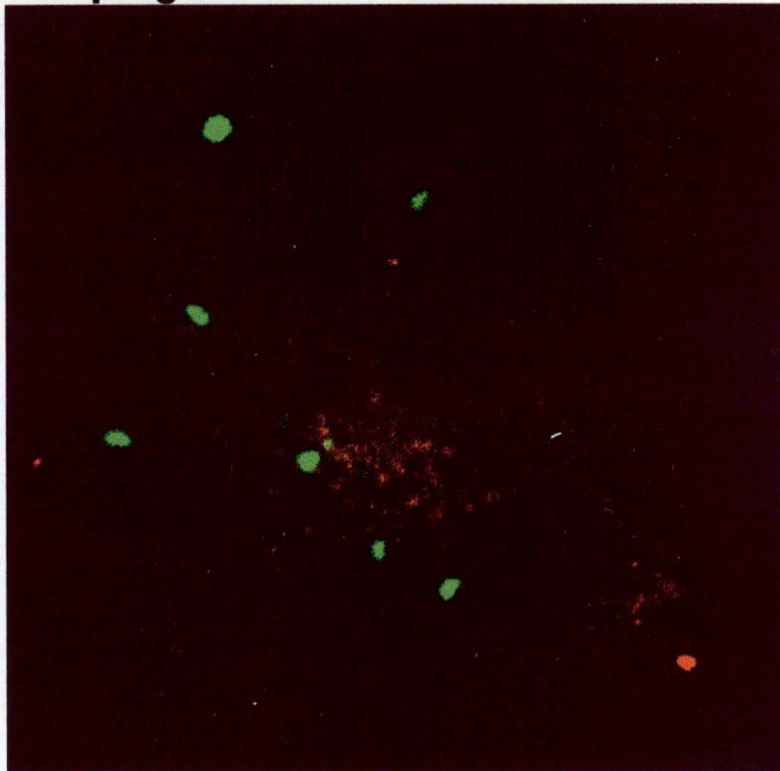
(A) EEA1 objectif 100 zoom 2.65



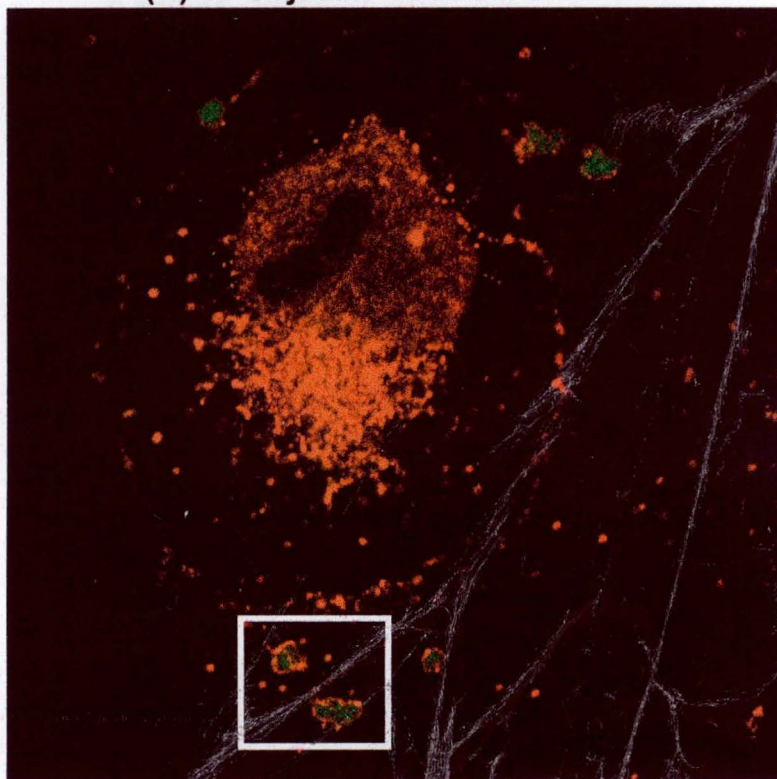
(B) Rab-7 objectif 100 zoom 1.20

Figure III.17 : Marquage des endosomes précoces par un anticorps anti-EEA1 (A) et des endosomes tardifs par un anticorps anti-Rab-7 (B) dans des cellules Cos-7, et observation en microscopie confocale.

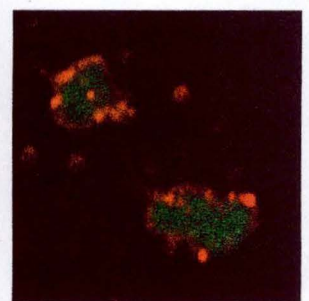
Marquage EEA1 : incubation 30 min



(A) SF objectif 100 zoom 3.39

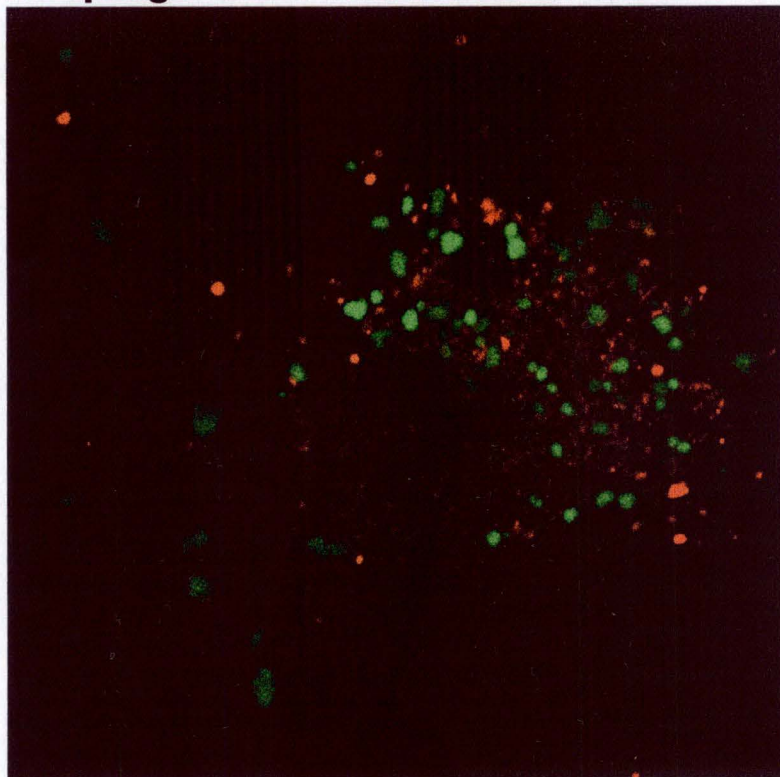


(B) MIWA A35 objectif 100 zoom 1.44

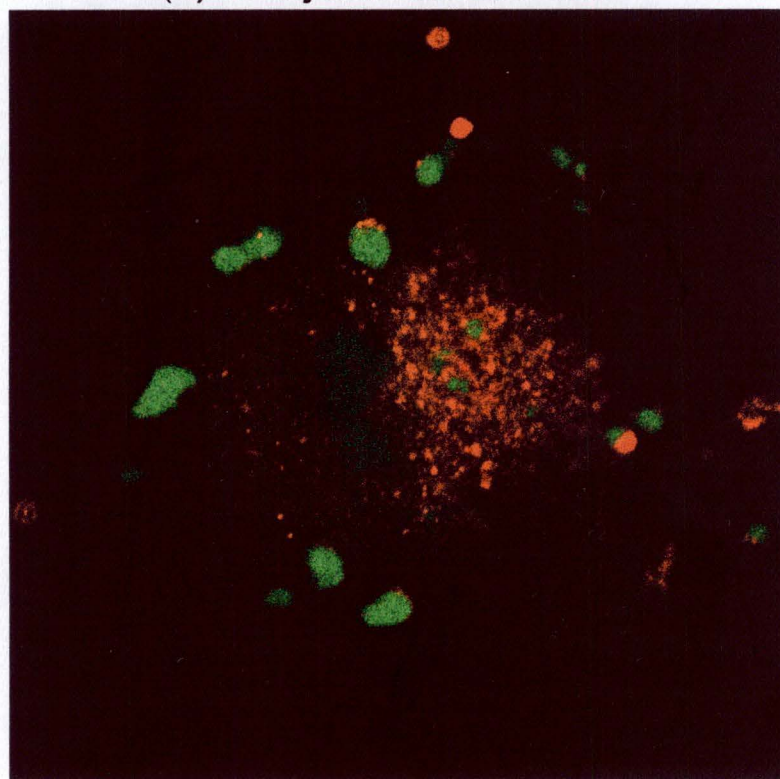


zoom3.31

Marquage EEA1 : incubation 4 heures

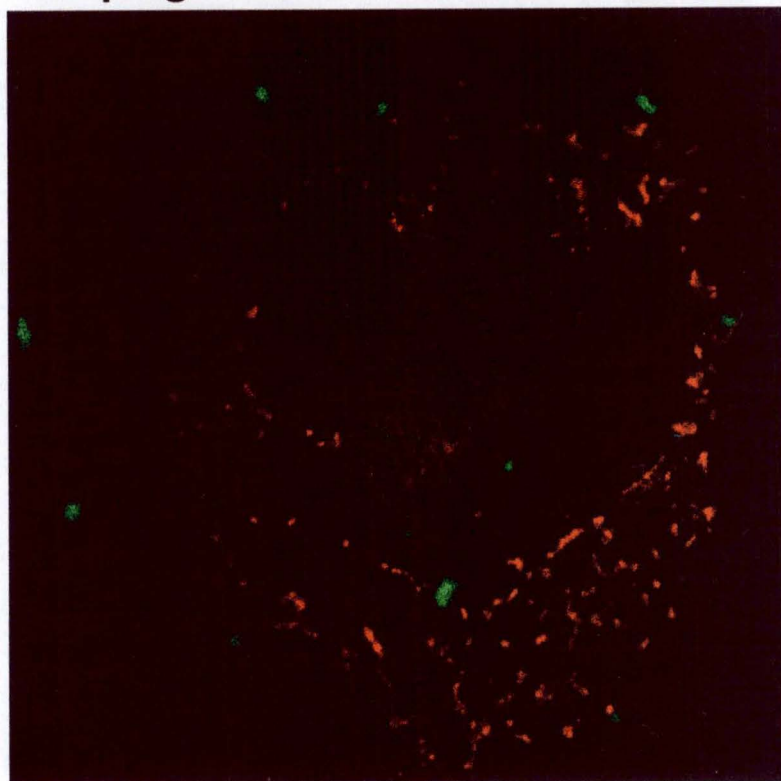


(C) SF objectif 100 zoom 1.62

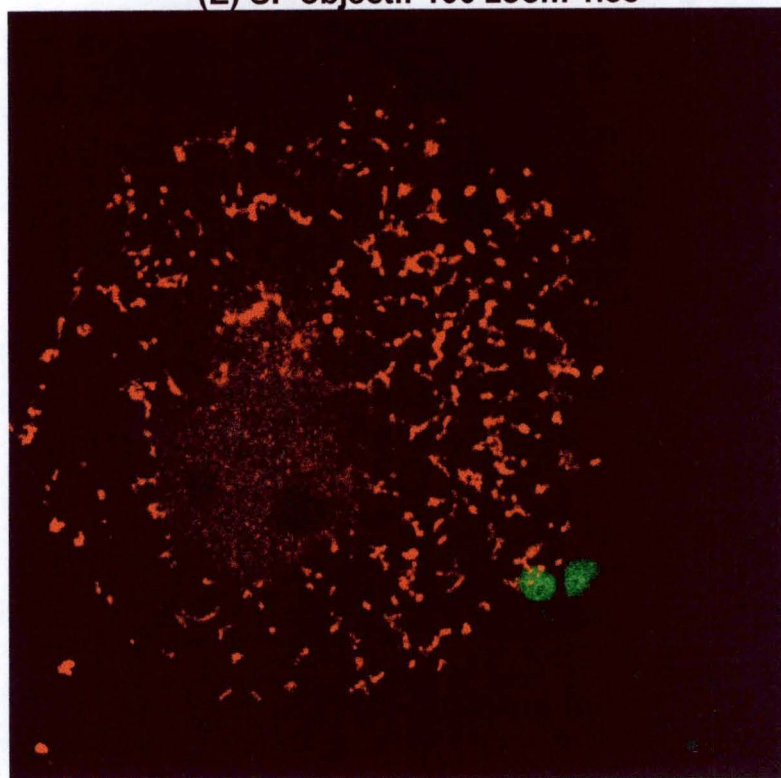


(D) MIWA A35 objectif 100 zoom 1.43

Marquage Rab-7 : incubation 30 min

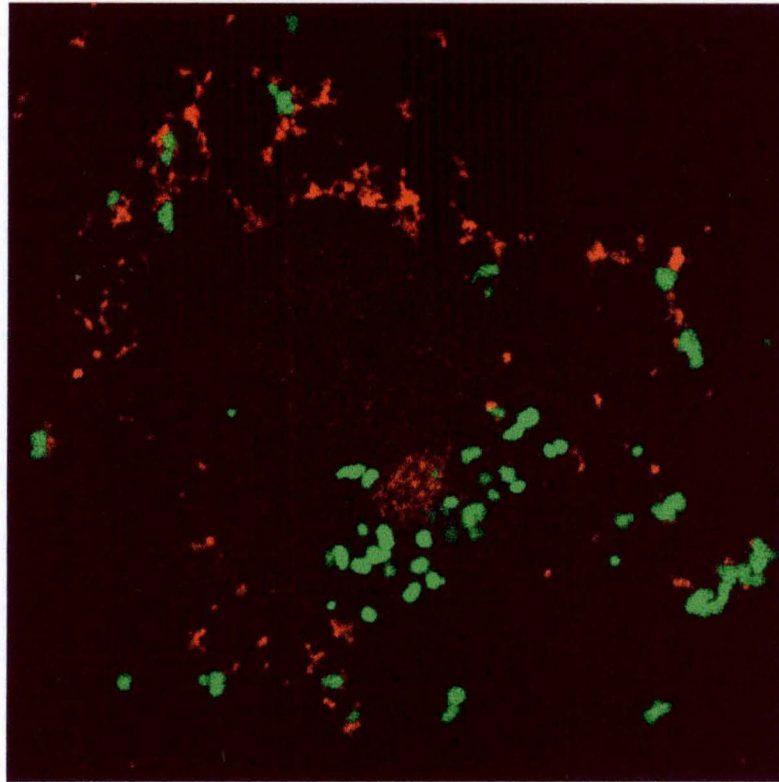


(E) SF objectif 100 zoom 1.55

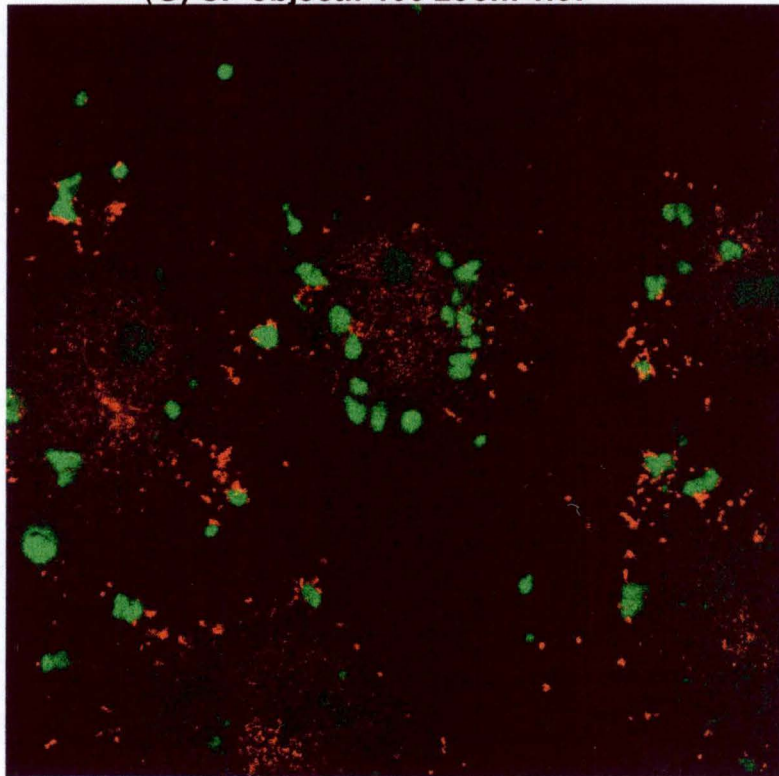


(F) MIWA A35 objectif 100 zoom 1.40

Marquage Rab-7 : incubation 4 heures



(G) SF objectif 100 zoom 1.67

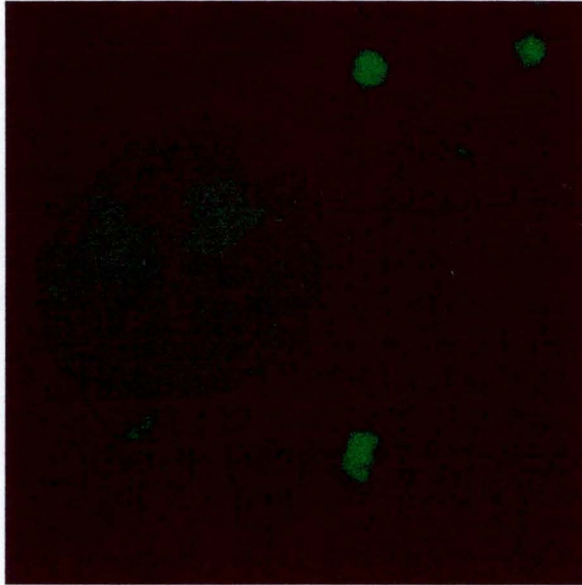


(H) MIWA A35 objectif 100 zoom 1.71

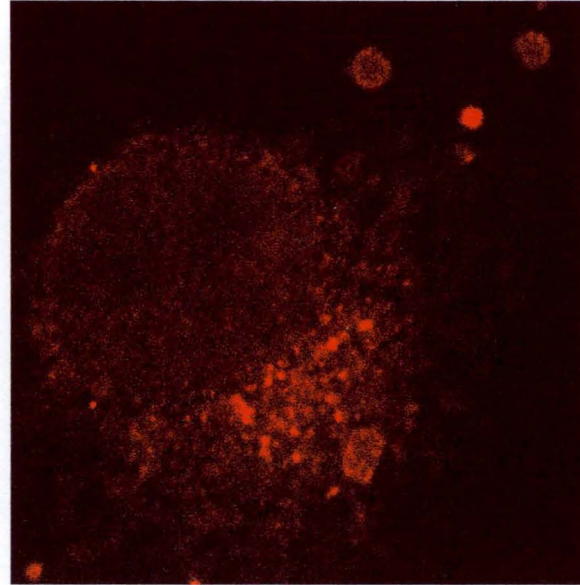
Figure III.18 : Images de cellules Cos-7 transfectées avec des complexes polymères MIWA A35/pCM β -YOYO-1 (B, D, F, H) et SF/pCM β -YOYO-1 (A, C, E, G), prises au microscope confocal. En vert : l'ADN plasmidique. En rouge : endosomes (images A, B, C et D : marquage EEA1 et E, F, G et H : marquage Rab-7. Les images A, B, E et F sont prises au temps 30 minutes de la cinétique et images C, D, G et H au temps 4h.

Marquage EEA1 : Incubation 1h30 (objectif 100 zoom 2.65)

Canal 1



Canal 2



Superposition

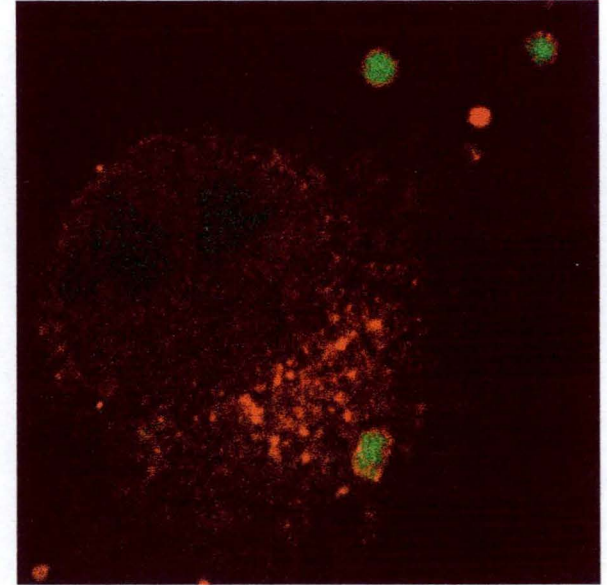


Figure III.19 : Images de cellules Cos-7 transfectées avec des complexes polymères MIWA A35/pCMV β , prises au microscope confocal au temps 1h30 de la cinétique. En vert : l'ADN plasmidique. En rouge : endosomes associés à EEA1.

III.4.2 Conclusions

La microscopie confocale est un outil puissant qui permet de montrer sans ambiguïté qu'un complexe est dans le noyau d'une cellule. Des complexes SF/ADN y ont d'ailleurs été observés.

De plus, cette technique nous a permis de nous rendre compte à quel point les complexes pouvaient avoir un comportement différent en transfection suivant leur nature et/ou leur structure :

- Nous avons observé clairement que les **complexes polymères MIWA A35/pCMVB** sont présents dans des vésicules « endosome-like » reconnues par des anticorps anti-EEA1 à 30 minutes jusqu'au temps 1h30 de la cinétique. A 30 minutes, nous avons détecté certaines vésicules « endosome-like » marquées par des anticorps anti-Rab-7, associées à certains complexes polymères MIWA A35/ADN. La fréquence de ces associations augmente au cours du temps. Ces complexes progresseraient donc dans la cellule par la voie endocytaire.
- Les **complexes SF/ADN** sont beaucoup plus petits que les complexes polymères MIWA A35/ADN et ceux-ci n'ont pas été observés dans les vésicules « endosome-like » associées à la protéine EEA1, pour des temps de transfection compris entre 30 minutes et 4 h. Les vésicules « endosome-like » associées à Rab-7 semblent accompagner les complexes SF/ADN au temps 2 h jusqu'à la fin de la cinétique. Il n'est donc pas exclu que ces complexes entrent dans la cellule par endocytose. Il est possible que ceux-ci se libèrent de l'endosome avant le temps 30 minutes de la cinétique.

Ces observations pourraient expliquer pourquoi nos polymères sont moins efficaces en transfection que le SF. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, il est important que les complexes soient relargués de l'endosome avant l'action hydrolytique des complexes par les nucléases acides des lysosomes. Afin d'améliorer le taux de transfection de nos complexes polymères/ADN, il faut rechercher des moyens pour favoriser ce relargage des endosomes plus rapidement.

Il s'agit toutefois d'une expérience préliminaire. Il est trop tôt pour tirer des conclusions définitives. Au contraire, cette expérience soulève beaucoup de questions, mais elle a l'avantage de montrer l'intérêt de cette technique dans la problématique abordée.

IV DISCUSSION, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le travail présenté dans ce mémoire s'intègre dans le cadre d'un projet de recherche appliquée, financée par la Région Wallonne. Il a pour but la mise au point de nouveaux polycations synthétiques, non-toxiques et hémocompatibles destinés à la vectorisation d'ADN dans les cellules de la paroi vasculaire. Le vecteur proposé est un polymère de poly(MADAM) (méthacrylate de diméthyl aminoéthyl) composé d'une dorsale de méthacrylate sur laquelle seront greffées différentes fonctions afin d'augmenter l'efficacité de transfection de ces polymères. L'optimisation de ces vecteurs synthétiques suppose un effort multidisciplinaire. Le projet Polyplex réunit trois laboratoires en réseau :

- le Service des Matériaux Polymères et Composites de l'UMH : qui se charge de synthétiser les vecteurs de poly(MADAM) par la méthode d'ATRP.
- L'Unité de Recherche en Biologie Cellulaire des FUNDP qui étudie l'efficacité des différents complexes polymères/ADN à transfecter des cellules et caractérise le cheminement des complexes polymères/ADN en microscopie confocale.
- le Laboratoire de Biochimie et de Physiologie Générale à l'ULG s'occupe de la caractérisation physico-chimique et de l'évaluation de la biocompatibilité des complexes vecteurs/ADN.

Au laboratoire de biologie cellulaire (URBC) et plus particulièrement au cours de ce mémoire, nous nous sommes intéressés :

- à optimiser les conditions de transfection des polymères de poly(MADAM).
- à étudier l'influence de la structure des polymères de poly(MADAM) et des polymères de poly(MADAM) avec amorce PEO sur le taux de transfection
- au cheminement intracellulaire des complexes polymères/ADN de la membrane plasmique jusqu'au noyau, à l'aide du microscope confocal.

Les polymères de poly(MADAM) envisagés ont des Mn de 15 000 à 37 000 Da, par comparaison à ceux décrits dans la littérature qui font entre 50 000 et 500 000 Da (van de Wetering, 1999). Nous avons choisi de travailler avec des polymères de plus petite taille, car cela permet une synthèse mieux contrôlée (avec une polydispersité plus faible). Ces polymères ont aussi une meilleure biocompatibilité.

Les résultats obtenus sont prometteurs. Tous les polymères de poly(MADAM) et polymères de poly(MADAM) avec amorce PEO que nous avons utilisés, permettent clairement la transfection des cellules Cos-7 même si le SuperFect, qui est notre agent de transfection de référence, donne de meilleurs résultats. Malheureusement, d'une expérience à l'autre, nous observons une grande variabilité dans l'activité transfectante des polymères.

IV.1 Optimisation des paramètres de transfection

Un premier axe de recherche a été d'optimiser certains paramètres de transfection pour diminuer cette variabilité, nous en avons développé trois :

- **le tampon de complexation :**

Nous avons comparé en transfection dans des cellules Cos-7, l'influence de trois tampons de complexation (HBS, PBS et le tampon phosphate).

Au sein d'une manipulation, le tampon HBS semble être un tampon plus adéquat que le tampon PBS ou le tampon phosphate, mais si nous regardons les activités β -gal moyennes sur l'ensemble des expériences réalisées dans les trois conditions, cette conclusion est moins évidente.

Nous avons pris la décision de continuer à tester nos polymères *in vitro* dans le tampon HBS pour se trouver dans les conditions optimales de transfection. Dans la suite du projet, lorsque l'équipe travaillera *in vivo*, les complexes seront formés dans le tampon PBS étant donné que nous ne pouvons pas injecter de l'HBS dans l'organisme.

- **la qualité de l'ADN :**

Après avoir testé en transfection notre ADN préparé dans des conditions « endofree » (pauvre en endotoxines) et notre ADN « normal », nous avons constaté que les taux de transfection étaient meilleurs au sein d'une manipulation avec l'ADN « endofree ». Si nous regardons les activités β -gal moyennes sur l'ensemble des expériences réalisées dans les deux conditions, cette conclusion est moins évidente.

Nous avons également testé en transfection de l'ADN de la firme PlasmidFactory. Cet ADN n'est pas réellement « endofree ». C'est un point que nous sommes en train d'éclaircir avec la firme. Par contre, cet ADN est plus riche en forme superenroulée que le nôtre, ce qui peut être un avantage pour la transfection. De fait, l'ADN de PlasmidFactory donne des résultats nettement supérieurs en transfection que notre ADN.

En conclusion, la qualité de l'ADN a une très grande influence sur le taux de transfection. L'absence ou présence d'endotoxines, la topologie dans laquelle se trouve l'ADN, sont donc des critères dont on doit également tenir compte.

- **l'ordre de préparation des complexes :**

Après avoir comparé trois modes de préparation des complexes en transfection avec nos polymères, nous avons remarqué l'importance de ce paramètre. Ajouter le polymère concentré en une seule fois à la solution de tampon/ADN, semble être une méthode efficace. C'est celle que nous utilisons depuis le début pour toutes les transfections. Vortexer les complexes est à proscrire, car cela diminue clairement le taux de transfection.

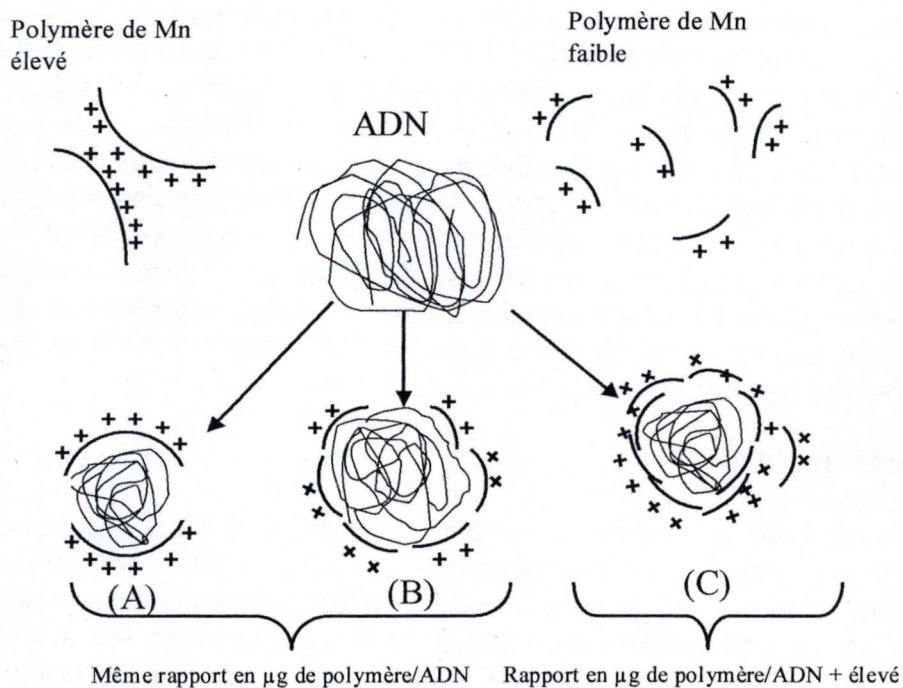


Figure IV.1 : Schéma expliquant l'influence de la longueur de la chaîne de MADAM sur le taux de transfection. (A) Polymère de grande taille portant des charges positives. Il condense fortement l'ADN. (B) Trois polymères de petits tailles, qui bout à bout, ont la même longueur et le même nombre de charges que le polymère de grande taille. L'ADN se condense moins bien. (C) Il faudra plus de polymères de petites tailles pour condenser l'ADN tout aussi bien que (A).

Ce ne sont pas les seuls paramètres à étudier. Jusqu'à présent, les tampons et milieux de culture sont préparés à pH 7,4. Il serait intéressant de diminuer le pH en dessous du pKa des polymères de poly(MADAM) qui est de 7,4 (van de Wetering et al, 1999) afin d'augmenter les charges positives des polymères. Cela pourrait favoriser la formation des complexes polymères/ADN qui se réalise par interactions électrostatiques et de ce fait, augmenter le taux de transfection pour des rapports polymères/ADN plus faibles. Le pH est donc un autre paramètre critique à étudier. Des expériences menées par l'équipe Polyplex sont actuellement en cours en URBC, pour évaluer l'effet du pH au cours de la complexation.

Cette étude nous montre donc que le système est très sensible aux écarts à l'idéalité, car il suffit d'une petite modification d'un paramètre (comme les trois étudiés ci-dessus) pour faire chuter considérablement le taux de transfection. Cette sensibilité est liée et aux polymères, et à la manipulation même de la transfection, qui reste délicate.

IV.2 Influence de la structure du polymère sur le taux de transfection

Non seulement le protocole de transfection est important, mais également la structure du polymère. Au cours de ce mémoire, ont été testées en transfection sur les cellules Cos-7 :

- l'influence de la longueur de la chaîne de MADAM,
- l'influence d'une amorce PEO.

IV.2.1 Influence de la longueur de la chaîne de MADAM

Nous avons travaillé avec des polymères de Mn compris entre 19 000 et 37 000 Da. Le rapport polymère/ADN dépend de la taille du polymère. En effet, pour les polymères de Mn élevé, nous devons ajouter moins de μg de polymères pour former les complexes par rapport à un polymère de masse plus petite. A nouveau, ceci suggère que le système est sensible car un doublement de taille du polymère provoque un glissement vers la droite des rapports polymère/ADN optimaux d'un facteur 3-4.

Nous expliquons ce phénomène par le fait que l'ADN se condense plus facilement avec un polymère de grande taille, qu'avec des polymères de petite taille pour un nombre de charges donné. Autrement dit, il faudra plus de molécules de polymères de petite taille pour condenser l'ADN aussi efficacement (figure IV.1).

IV.2.2 Influence d'une amorce PEO

Dans cette première partie, nous avons également abordé un autre aspect qui est l'influence d'une amorce de 10 éléments de PEO (figure III.3A) dans le prolongement de la dorsale de méthacrylate, sur le taux de transfection.

Nous avons testé l'influence de cette amorce PEO en transfection sur les cellules Cos-7 et cherché à voir si :

- ces co-polymères transfectent toujours les cellules Cos-7, car l'ajout d'une amorce PEO pourrait gêner la transfection des cellules ;
- l'amorce de PEO diminue bien la toxicité des complexes vis-à-vis des cellules par rapport aux complexes poly(MADAM)/ADN sans PEO ;
- l'amorce de PEO joue son rôle de protection, empêchant l'interaction des protéines du sérum avec les complexes, en comparant les efficacités de transfection des co-polymères avec et sans PEO.

Les trois polymères de poly(MADAM) comportant une amorce PEO, ont toujours la capacité de transfecter les cellules. Ce sont les premiers polymères de poly(MADAM) avec PEO qui donnent des résultats positifs. Les polymères contenant des éléments PEO placés aléatoirement dans le prolongement de la dorsale de méthacrylate (III.3B) ont déjà été testés par l'équipe et aucune activité β -gal n'a été détectée.

Si nous comparons le taux de transfection des polymères de poly(MADAM) avec une amorce PEO et des polymères de poly(MADAM) sans PEO de même Mn en poly(MADAM), les activités β -gal maximales ont tendance à être plus faibles dans le cas des copolymères.

Nous avons également comparé la toxicité des polymères de poly(MADAM) avec celle des polymères de poly(MADAM) avec une amorce PEO. Nous avons constaté que les amorces de PEO réduisent légèrement la toxicité vis-à-vis des cellules.

Nous avons transfecté des cellules Cos-7 avec des complexes sans PEO et avec PEO en présence de FBS à 2% et 5% pendant la période d'incubation des complexes avec les cellules. Les complexes sans PEO sont peu affectés par la présence de sérum, contrairement aux complexes contenant du PEO. Le PEO sous forme d'amorce de 10 éléments, n'améliore donc pas la transfection en présence de sérum.

En conclusion, une amorce de PEO de 10 éléments interfère peu avec la transfection. Mais, cette amorce n'est peut-être pas assez longue pour réduire pleinement la toxicité des complexes vis-à-vis des cellules et améliorer l'efficacité de transfection en présence de sérum.

Synthétiser des polymères de poly(MADAM) comportant des amorces de PEO plus longues est envisageable.

Des polymères de poly(MADAM) avec des chaînes de PEO à bloc (figure III.3C) seront également prochainement testés. La position des chaînes de PEO doit à priori laisser suffisamment de charges positives accessibles pour interagir avec l'ADN contrairement aux chaînes de PEO placées aléatoirement.

IV.3 Etude du cheminement intracellulaire des complexes en microscopie confocale

La deuxième partie du mémoire, plus fondamentale, a été entreprise pour essayer de mieux comprendre les comportements des complexes SF/ADN et polymère/ADN à l'intérieur de la cellule au moyen du microscope confocal. Il s'agit d'une expérience préliminaire que nous n'avons pas pu approfondir. Les résultats obtenus sont cependant prometteurs et justifient que l'on continue dans cette voie.

Nous avons transfecté des cellules Cos-7 avec les complexes polymères MIWA A35/ pCMV β -YOYO-1 et SF/ pCMV β -YOYO-1. Nous avons réalisé une cinétique d'incorporation des complexes : les cellules ont été fixées de demi heure en demi heure jusqu'au temps 4 heures. Les endosomes ont ensuite été marqués avec les anticorps primaires et secondaires et l'ADN endogène avec le TOPRO. Les cellules ont été observées en microscopie confocale.

Des complexes SF/ADN ont pu être observés sans ambiguïté dans le noyau de plusieurs cellules.

De plus, cette technique nous a permis de nous rendre compte à quel point les complexes pouvaient avoir un comportement différent en transfection suivant leur nature et/ou leur structure :

- Nous avons observé clairement que les **complexes polymères MIWA A35/pCMV β** sont présents dans des vésicules « endosome-like » reconnues par des anticorps anti-EEA1 de 30 minutes à 1h30 après l'addition des complexes aux cellules. A 30 minutes, nous avons détecté certaines vésicules « endosome-like » reconnues par des anticorps anti-Rab-7, associées à certains complexes polymères MIWA A35/ADN et la fréquence de ces associations semble augmenter au cours du temps. Ces complexes pourraient donc progresser dans la cellule par la voie endocytaire. Pour être tout à fait complet dans cette étude, il serait intéressant de marquer les lysosomes afin de voir si un grand nombre de complexes polymère/ADN est libéré des endosomes avant qu'ils n'arrivent aux lysosomes.
- Les **complexes SF/ADN** sont beaucoup plus petits que les complexes polymères MIWA A35/ADN et la cinétique d'internalisation semble plus rapide. Contrairement aux polyplexes MIWA A35/ADN, nous n'avons pas observé de complexes SF/ADN dans les structures « endosome-

like » associées à la protéine EEA1, pour des temps de transfection compris entre 30 minutes et 4 h (de 30 minutes en 30 minutes). Les vésicules « endosome-like » positives pour la protéine Rab-7 semblent accompagner les complexes SF/ADN au temps 2 h jusqu'à la fin de la cinétique. Il n'est donc pas exclu que ces complexes entrent dans la cellule par endocytose. Il est possible que ceux-ci se libèrent de ces vésicules avant le temps 30 minutes de la cinétique.

Afin de vérifier si les complexes SF/ADN entrent oui ou non par la voie d'endocytose dans la cellule, il est indispensable de recommencer la même expérience mais en fixant les cellules à des temps inférieurs à 30 minutes puisque la cinétique d'internalisation des complexes est assez rapide. Enfin, il faudra tester l'effet d'agents reconnus pour inhiber la voie endocytaire (Zelphati et Szoka, 1996), pour voir dans quelle mesure l'efficacité de transfection est affectée pour les complexes SF/ADN.

Cette expérience préliminaire soulève bien évidemment beaucoup de questions :

- La répartition inattendue des endosomes dans la cellule : les endosomes précoces semblent plus proches du noyau que les endosomes tardifs qui se localisent, quant à eux dans toute la cellule sous forme d'un réseau. Il serait plus logique d'observer les endosomes précoces, proches de la membrane plasmique. Ceux-ci évolueraient en endosomes tardifs en se rapprochant du noyau.
- les complexes SF/ADN et polymères MIWA A35/ADN ne semblent pas vraiment être dans les vésicules contenant Rab-7, mais y semblent plutôt associés.

IV.4 Conclusions

En conclusion générale : grâce à l'optimisation de certains paramètres de transfection, l'efficacité des polymères en transfection est nettement augmentée.

Il est envisageable de greffer du PEO pour améliorer la structure des polymères car les polymères de poly(MADAM) avec une amorce PEO donnent des résultats encourageants.

En outre, il est maintenant possible de suivre les complexes polymères/ADN en microscopie confocale, de la membrane plasmique au noyau en incorporant des molécules de YOYO-1 entre les bases de l'ADN. Cela nous permettra d'établir des liens entre structure et fonction des polymères prochainement synthétisés.

Notre travail a montré que la transfection est un phénomène complexe, qu'elle est très sensible aux moindres écarts à l'idéalité et que pour chaque type de vecteur envisagé, il est impératif de rechercher les conditions expérimentales optimales. La structure du polycation a évidemment beaucoup d'importance.

Dans le projet, le choix s'est porté sur un polymère de méthacrylate.

Nos résultats suggèrent qu'il est possible de modifier finement ce polymère de base pour améliorer la structure.

Enfin, la microscopie confocale s'est avérée être un outil très important pour étudier le cheminement des complexes à travers la cellule, même si de nombreuses questions restent en suspens, et nous avons pu détecter l'ADN plasmidique exogène de manière non ambiguë dans le noyau, après transfection avec les polyplexes.

V BIBLIOGRAPHIE

Alexakis T, Boadi DK, Quong D, Groboillot A, O'Neill I, Poncelet D, and Neufeld RJ. 1995. *Microencapsulation of DNA within alginate microspheres and crosslinked chitosan membranes for in vivo application.* *Appl Biochem Biotechnol* 50: 93-106.

Anderson RG, Kamen BA, Rothberg KG, and Lacey SW. 1992. *Potocytosis: sequestration and transport of small molecules by caveolae.* *Science* 255: 410-1.

Anwer K, Kao G, Proctor B, Rolland A, and Sullivan S. 2000. *Optimization of cationic lipid/DNA complexes for systemic gene transfer to tumor lesions.* *J Drug Target* 8: 125-35.

Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, Hong JS, Horwitz MS, Crowell RL, and Finberg RW. 1997. *Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5.* *Science* 275: 1320-3.

Blacklow NR. 1988. *Adeno-associated viruses of humans.* In: J. Pattison (ed) *Parvoviruses and Human Disease*.: 165-174.

Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, and Behr JP. 1995. *A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine.* *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 7297-301.

Boussif O, Zanta MA, and Behr JP. 1996. *Optimized galenics improve in vitro gene transfer with cationic molecules up to 1000-fold.* *Gene Ther* 3: 1074-80.

Bragonzi A, Boletta A, Biffi A, Muggia A, Sersale G, Cheng SH, Bordignon C, Assael BM, and Conese M. 1999. *Comparison between cationic polymers and lipids in mediating systemic gene delivery to the lungs.* *Gene Ther* 6: 1995-2004.

Brunner S, Sauer T, Carotta S, Cotten M, Saltik M, and Wagner E. 2000. *Cell cycle dependence of gene transfer by lipoplex, polyplex and recombinant adenovirus.* *Gene Ther* 7: 401-7.

Bukrinsky MI, Haggerty S, Dempsey MP, Sharova N, Adzhubel A, Spitz L, Lewis P, Goldfarb D, Emerman M, and Stevenson M. 1993. *A nuclear localization signal within HIV-1 matrix protein that governs infection of non-dividing cells.* *Nature* 365: 666-9.

Buller RM, Janik JE, Sebring ED, and Rose JA. 1981. *Herpes simplex virus types 1 and 2 completely help adenovirus- associated virus replication.* *J Virol* 40: 241-7.

Capecchi MR. 1980. *High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells.* *Cell* 22: 479-88.

Capecchi MR. 1989. *The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting.* *Trends Genet* 5: 70-6.

Cartier R, and Reszka R. 2002. *Utilization of synthetic peptides containing nuclear localization signals for nonviral gene transfer systems.* *Gene Ther* 9: 157-67.

Chandy T, and Sharma CP. 1990. *Chitosan--as a biomaterial.* *Biomater Artif Cells Artif Organs* 18: 1-24.

Chemin I, Moradpour D, Wieland S, Offensperger WB, Walter E, Behr JP, and Blum HE. 1998. *Liver-directed gene transfer: a linear polyethylenimine derivative mediates highly efficient DNA delivery to primary hepatocytes in vitro and in vivo.* *J Viral Hepat* 5: 369-75.

Chen QR, Zhang L, Stass SA, and Mixson AJ. 2000. *Co-polymer of histidine and lysine markedly enhances transfection efficiency of liposomes.* *Gene Ther* 7: 1698-705.

Cherng JY, Schuurmans-Nieuwenbroek NM, Jiskoot W, Talsma H, Zuidam NJ, Hennink WE, and Crommelin DJ. 1999. *Effect of DNA topology on the transfection efficiency of poly((2-dimethylamino)ethyl methacrylate)-plasmid complexes.* *J Control Release* 60: 343-53.

Chu G, Hayakawa H, and Berg P. 1987. *Electroporation for the efficient transfection of mammalian cells with DNA.* *Nucleic Acids Res* 15: 1311-26.

Cristiano RJ, and Roth JA. 1996. *Epidermal growth factor mediated DNA delivery into lung cancer cells via the epidermal growth factor receptor.* *Cancer Gene Ther* 3: 4-10.

Crystal RG. 1995. *Transfer of genes to humans: early lessons and obstacles to success.* *Science* 270: 404-10.

Culver KW, Ram Z, Wallbridge S, Ishii H, Oldfield EH, and Blaese RM. 1992. *In vivo gene transfer with retroviral vector-producer cells for treatment of experimental brain tumors.* *Science* 256: 1550-2.

Danielsen M, Northrop JP, and Ringold GM. 1986. *The mouse glucocorticoid receptor: mapping of functional domains by cloning, sequencing and expression of wild-type and mutant receptor proteins.* *Embo J* 5: 2513-22.

Dash PR, Read ML, Barrett LB, Wolfert MA, and Seymour LW. 1999. *Factors affecting blood clearance and in vivo distribution of polyelectrolyte complexes for gene delivery.* *Gene Ther* 6: 643-50.

Dash PR, Wolfert MA, and Seymour LW. 1999. *polycation-based delivery systems for receptor-mediated gene delivery.* In: Rolland A, ed. *Advanced Gene Delevery from concepts to pharmaceutical products*: Harwoo academic

publishers. 143-174.

Dautry-Varsat A, Ciechanover A, and Lodish HF. 1983. *pH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis. Proc Natl Acad Sci U S A 80: 2258-62.*

Duan. 1999. *Circular intermediates of recombinant adeno-associated virus have defined structural characteristics responsible for long-term episomal persistence in muscle tissue. J. Virol 73.*

Erbacher P, Roche AC, Monsigny M, and Midoux P. 1996. *Putative role of chloroquine in gene transfer into a human hepatoma cell line by DNA/lactosylated polylysine complexes. Exp Cell Res 225: 186-94.*

Escriou V, Carriere M, Bussone F, Wils P, and Scherman D. 2001. *Critical assessment of the nuclear import of plasmid during cationic lipid-mediated gene transfer. J Gene Med 3: 179-87.*

Farhood H, Bottega R, Epand RM, and Huang L. 1992. *Effect of cationic cholesterol derivatives on gene transfer and protein kinase C activity. Biochim Biophys Acta 1111: 239-46.*

Farhood H, Serbina N, and Huang L. 1995. *The role of dioleoyl phosphatidylethanolamine in cationic liposome mediated gene transfer. Biochim Biophys Acta 1235: 289-95.*

Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, and Danielsen M. 1987. *Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. Proc Natl Acad Sci U S A 84: 7413-7.*

Ferrari S, Moro E, Pettenazzo A, Behr JP, Zacchello F, and Scarpa M. 1997. *ExGen 500 is an efficient vector for gene delivery to lung epithelial cells in vitro and in vivo. Gene Ther 4: 1100-6.*

Godbey WT, Wu KK, and Mikos AG. 1999. *Poly(ethylenimine) and its role in gene delivery. J Control Release 60: 149-60.*

Goldberg RI, Smith RM, and Jarett L. 1987. *Insulin and alpha 2-macroglobulin-methylamine undergo endocytosis by different mechanisms in rat adipocytes: I. Comparison of cell surface events. J Cell Physiol 133: 203-12.*

Goldstein JL, Brown MS, Anderson RG, Russell DW, and Schneider WJ. 1985. *Receptor-mediated endocytosis: concepts emerging from the LDL receptor system. Annu Rev Cell Biol 1: 1-39.*

Gorlich D, and Mattaj IW. 1996. *Nucleocytoplasmic transport. Science 271: 1513-8.*

Gottschalk S, Cristiano RJ, Smith LC, and Woo SL. 1994. *Folate receptor*

mediated DNA delivery into tumor cells: potosomal disruption results in enhanced gene expression. *Gene Ther* 1: 185-91.

Graham FL, and van der Eb AJ. 1973. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52: 456-67.

Greber UF, and Kasamatsu H. 1996. Nuclear targeting of SV40 and adenovirus. *Trends Cell Biol* 6: 189-195.

Gruenberg J, and Maxfield FR. 1995. Membrane transport in the endocytic pathway. *Curr Opin Cell Biol* 7: 552-63.

Hamm-Alvarez SF. 1998. Molecular motors and their role in membrane traffic. *Adv Drug Deliv Rev* 29: 229-242.

Harvie P, Wong FM, and Bally MB. 2000. Use of poly(ethylene glycol)-lipid conjugates to regulate the surface attributes and transfection activity of lipid-DNA particles. *J Pharm Sci* 89: 652-63. [pii].

Havel RJ. 1998. Receptor and non-receptor mediated uptake of chylomicron remnants by the liver. *Atherosclerosis* 141 Suppl 1: S1-7.

Hein M, Ernst M, Moller F, and Regensburger D. 1998. Gene transfer into rat heart-derived endothelial cells. *Eur J Cardiothorac Surg* 13: 460-6.

Heini PF, and Berlemann U. 2001. Bone substitutes in vertebroplasty. *Eur Spine J* 10 Suppl 2: S205-13.

Hirano S, Seino H, Akiyama Y, and Nonaka I. 1998. Biocompatibility of chitosan by oral and intravenous administration. *Polym. Eng. Sci.* 59: 897-901.

Horwitz MS. 1996. Adenoviridae and their replication. In: B.N. Fields and D. M. Knipe. *Virology* Raven Press: 1679-1740.

Houk BE, Hochhaus G, and Hughes JA. 1999. Kinetic modeling of plasmid DNA degradation in rat plasma. *AAPS PharmSci* 1.

Ishii T, Okahata Y, and Sato T. 2001. Mechanism of cell transfection with plasmid/chitosan complexes. *Biochim Biophys Acta* 1514: 51-64.

Ishiwata H, Suzuki N, Ando S, Kikuchi H, and Kitagawa T. 2000. Characteristics and biodistribution of cationic liposomes and their DNA complexes. *J Control Release* 69: 139-48.

Ito A, Miyazoe R, Mitoma J, Akao T, Osaki T, and Kunitake T. 1990. Synthetic cationic amphiphiles for liposome-mediated DNA transfection. *Biochem Int* 22: 235-41.

Jain RK. 1997. Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors.

Adv Drug Deliv Rev 26: 71-90.

Johnson OL, Jaworowicz W, Cleland JL, Bailey L, Charnis M, Duenas E, Wu C, Shepard D, Magil S, Last T, Jones AJ, and Putney SD. 1997. *The stabilization and encapsulation of human growth hormone into biodegradable microspheres.* *Pharm Res* 14: 730-5.

Kamiya H, Tsuchiya H, Yamazaki J, and Harashima H. 2001. *Intracellular trafficking and transgene expression of viral and non-viral gene vectors.* *Adv Drug Deliv Rev* 52: 153-64.

Kawai S, and Nishizawa M. 1984. *New procedure for DNA transfection with polycation and dimethyl sulfoxide.* *Mol Cell Biol* 4: 1172-4.

Kichler A, Leborgne C, Coeytaux E, and Danos O. 2001. *Polyethylenimine-mediated gene delivery: a mechanistic study.* *J Gene Med* 3: 135-44.

Kim JS, Maruyama A, Akaike T, and Kim SW. 1998. *Terplex DNA delivery system as a gene carrier.* *Pharm Res* 15: 116-21.

Kircheis R, Kichler A, Wallner G, Kursa M, Ogris M, Felzmann T, Buchberger M, and Wagner E. 1997. *Coupling of cell-binding ligands to polyethylenimine for targeted gene delivery.* *Gene Ther* 4: 409-18.

Kircheis R, Wightman L, and Wagner E. 2001. *Design and gene delivery activity of modified polyethylenimines.* *Adv Drug Deliv Rev* 53: 341-58.

Klemm AR, Young D, and Lloyd JB. 1998. *Effects of polyethyleneimine on endocytosis and lysosome stability.* *Biochem Pharmacol* 56: 41-6.

Kopecek J, Kopeckova P, Minko T, and Lu Z. 2000. *HPMA copolymer-anticancer drug conjugates: design, activity, and mechanism of action.* *Eur J Pharm Biopharm* 50: 61-81.

Kurzchalia TV, Dupree P, and Monier S. 1994. *VIP21-Caveolin, a protein of the trans-Golgi network and caveolae.* *FEBS Lett* 346: 88-91.

Lamaze C, and Schmid SL. 1995. *The emergence of clathrin-independent pinocytic pathways.* *Curr Opin Cell Biol* 7: 573-80.

Laurent N. 2001. *Capture et sort intracellulaire de complexes ADN plasmidique/vecteurs cationiques.* *Faculté de médecine - département de chimie physiologique.*

Lechardeur D, Sohn KJ, Haardt M, Joshi PB, Monck M, Graham RW, Beatty B, Squire J, O'Brodovich H, and Lukacs GL. 1999. *Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: a potential barrier to gene transfer.* *Gene Ther* 6: 482-97.

Leventis R, and Silvius JR. 1990. *Interactions of mammalian cells with lipid*

dispersions containing novel metabolizable cationic amphiphiles. *Biochim Biophys Acta* 1023: 124-32.

Lowry OH. 1951. *Protein measurement with the Folin phenol reagent.* *Biol. Chem.* 193: 265-275.

Luby-Phelps K, Castle PE, Taylor DL, and Lanni F. 1987. *Hindered diffusion of inert tracer particles in the cytoplasm of mouse 3T3 cells.* *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 4910-3.

Luo D, and Saltzman WM. 2000. *Synthetic DNA delivery systems.* *Nat Biotechnol* 18: 33-7.

Luthman H, and Magnusson G. 1983. *High efficiency polyoma DNA transfection of chloroquine treated cells.* *Nucleic Acids Res* 11: 1295-308.

Malone RW, Felgner PL, and Verma IM. 1989. *Cationic liposome-mediated RNA transfection.* *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 6077-81.

McPherson RA, Rosenthal LJ, and Rose JA. 1985. *Human cytomegalovirus completely helps adeno-associated virus replication.* *Virology* 147: 217-22.

Mechtler K, and Wagner E. 1997. *Gene transfer mediated by influenza virus peptides : the role of the peptide sequences.* *New J. chemistry* 21: 105-111.

Midoux P, and Monsigny M. 1999. *Efficient gene transfer by histidylated polylysine/pDNA complexes.* *Bioconjug Chem* 10: 406-11.

Mortimer I, Tam P, MacLachlan I, Graham RW, Saravolac EG, and Joshi PB. 1999. *Cationic lipid-mediated transfection of cells in culture requires mitotic activity.* *Gene Ther* 6: 403-11.

Mu FT, Callaghan JM, Steele-Mortimer O, Stenmark H, Parton RG, Campbell PL, McCluskey J, Yeo JP, Tock EP, and Toh BH. 1995. *EEA1, an early endosome-associated protein. EEA1 is a conserved alpha-helical peripheral membrane protein flanked by cysteine "fingers" and contains a calmodulin-binding IQ motif.* *J Biol Chem* 270: 13503-11.

Mumper RJ, and Rolland A. 1997. *Chitosan related compositions for delivery of nucleic acids into a cell.* W097/42975.

Mumper RJ, Russell J, Scott L, and Klapkamp. 1999. *polymeric gene delivery systems for in vivo gene therapy.* In: Rolland A, ed. *Advanced Gene Delevery from concepts to pharmaceutical products*: Harwoo academic publishers. 143-174.

Mumper RJ, wang J, Claspell JM, and Rolland A. 1995. *Novel polymeric condensing carriers for gene delivery.* *Proceed. Intern. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 22: 178-179.

Muzyczka N. 1992. *Use of adeno-associated virus as a general transduction vector for mammalian cells.* *Curr Top Microbiol Immunol* 158: 97-129.

Muzzarelli R. 1994. *In vivo biochemical significance of chitin-based medical items.* S Dumitriu Marcel Dekker, Inc. New York.

Nath ST, and Nayak DP. 1990. *Function of two discrete regions is required for nuclear localization of polymerase basic protein 1 of A/WSN/33 influenza virus (H1 N1).* *Mol Cell Biol* 10: 4139-45.

Nguyen HK, Lemieux P, Vinogradov SV, Gebhart CL, Guerin N, Paradis G, Bronich TK, Alakhov VY, and Kabanov AV. 2000. *Evaluation of polyether-polyethyleneimine graft copolymers as gene transfer agents.* *Gene Ther* 7: 126-38.

Ogris M, Brunner S, Schuller S, Kircheis R, and Wagner E. 1999. *PEGylated DNA/transferrin-PEI complexes: reduced interaction with blood components, extended circulation in blood and potential for systemic gene delivery.* *Gene Ther* 6: 595-605.

Ogris M, Wagner E, and Steinlein P. 2000. *A versatile assay to study cellular uptake of gene transfer complexes by flow cytometry.* *Biochim Biophys Acta* 1474: 237-43.

Ohashi T, Boggs S, Robbins P, Bahnson A, Patrene K, Wei FS, Wei JF, Li J, Lucht L, Fei Y, and et al. 1992. *Efficient transfer and sustained high expression of the human glucocerebrosidase gene in mice and their functional macrophages following transplantation of bone marrow transduced by a retroviral vector.* *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 11332-6.

Pangburn SH, Trescony PV, and Heller J. 1982. *Lysozyme degradation of partially deacetylated chitin, its films and hydrogels.* *Biomaterials* 3: 105-8.

Plank C, Mechtler K, Szoka FC, Jr., and Wagner E. 1996. *Activation of the complement system by synthetic DNA complexes: a potential barrier for intravenous gene delivery.* *Hum Gene Ther* 7: 1437-46.

Plank C, Oberhauser B, Mechtler K, Koch C, and Wagner E. 1994. *The influence of endosome-disruptive peptides on gene transfer using synthetic virus-like gene transfer systems.* *J Biol Chem* 269: 12918-24.

Plank C, Zatloukal K, Cotten M, Mechtler K, and Wagner E. 1992. *Gene transfer into hepatocytes using asialoglycoprotein receptor mediated endocytosis of DNA complexed with an artificial tetra- antennary galactose ligand.* *Bioconjug Chem* 3: 533-9.

Pollard H, Remy JS, Loussouarn G, Demolombe S, Behr JP, and Escande D. 1998. *Polyethylenimine but not cationic lipids promotes transgene delivery to the nucleus in mammalian cells.* *J Biol Chem* 273: 7507-11.

Pouton CW, and Colin W. 1999. Biological barriers to gene transfer. In: Rolland A, ed. *Advanced Gene Delivery from concepts to pharmaceutical products*: Harwood academic publishers. 65-102.

Pouton CW, Lucas P, Thomas BJ, Uduchi AN, Milroy DA, and Moss SH. 1998. Polycation-DNA complexes for gene delivery: a comparison of the biopharmaceutical properties of cationic polypeptides and cationic lipids. *J Control Release* 53: 289-99.

QIAGEN. 1999. *The QIAGEN Transfection Resource Book*. 11-12.

QIAGEN. 2000. *QIAGEN Product Guide 2000*.

Rafalski M, Ortiz A, Rockwell A, van Ginkel LC, Lear JD, DeGrado WF, and Wilschut J. 1991. Membrane fusion activity of the influenza virus hemagglutinin: interaction of HA2 N-terminal peptides with phospholipid vesicles. *Biochemistry* 30: 10211-20.

Remy JS, Sirlin C, Vierling P, and Behr JP. 1994. Gene transfer with a series of lipophilic DNA-binding molecules. *Bioconjug Chem* 5: 647-54.

Remy-Kristensen A, Clamme JP, Vuilleumier C, Kuhry JG, and Mely Y. 2001. Role of endocytosis in the transfection of L929 fibroblasts by polyethylenimine/DNA complexes. *Biochim Biophys Acta* 1514: 21-32.

Robinson MS, Watts C, and Zerial M. 1996. Membrane dynamics in endocytosis. *Cell* 84: 13-21.

Rosenfeld MA, Siegfried W, Yoshimura K, Yoneyama K, Fukayama M, Stier LE, Paakko PK, Gilardi P, Stratford-Perricaudet LD, Perricaudet M, and et al. 1991. Adenovirus-mediated transfer of a recombinant alpha 1-antitrypsin gene to the lung epithelium in vivo. *Science* 252: 431-4.

Roy K, Mao HQ, Huang SK, and Leong KW. 1999. Oral gene delivery with chitosan--DNA nanoparticles generates immunologic protection in a murine model of peanut allergy. *Nat Med* 5: 387-91.

Rungsardthong U, Deshpande M, Bailey L, Vamvakaki M, Armes SP, Garnett MC, and Stolnik S. 2001. Copolymers of amine methacrylate with poly(ethylene glycol) as vectors for gene therapy. *J Control Release* 73: 359-80.

Sawamura T, Kume N, Aoyama T, Moriwaki H, Hoshikawa H, Aiba Y, Tanaka T, Miwa S, Katsura Y, Kita T, and Masaki T. 1997. An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein. *Nature* 386: 73-7.

Schnitzer JE, Oh P, Pinney E, and Allard J. 1994. Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules. *J Cell Biol* 127: 1217-32.

- Song YK, Liu F, Chu S, and Liu D. 1997. *Characterization of cationic liposome-mediated gene transfer in vivo by intravenous administration. Hum Gene Ther* 8: 1585-94.
- Sosnowski BA, Gonzalez AM, Chandler LA, Buechler YJ, Pierce GF, and Baird A. 1996. *Targeting DNA to cells with basic fibroblast growth factor (FGF2). J Biol Chem* 271: 33647-53.
- Steinhauer DA, Wharton SA, Skehel JJ, and Wiley DC. 1995. *Studies of the membrane fusion activities of fusion peptide mutants of influenza virus hemagglutinin. J Virol* 69: 6643-51.
- Suh J, Paik H-Y, and Hwang BK. 1994. *Ionizaion of Poly(ethyleneimine) and Poly(allylamine) at Various pH's. Bioorg. Chem* 22: 318-327.
- Thorpe PE, and Burrows FJ. 1995. *Antibody-directed targeting of the vasculature of solid tumors. Breast Cancer Res Treat* 36: 237-51.
- Toth I, Sakthivel T, Wilderspin AF, Bayele H, Odonnell M, Perry DJ, K.J. P, Lee CA, and Florence AT. 1999. *Novel Cationic lipidic peptide dendrimer vectors - in vitro gene delivery. STP Pharma Sciences* 9: 93-99.
- Traian V, and Chirila. 2001. *An overview of the development of artificial corneas with porous skirts and the use of PHEMA for such an application. Biomaterials* 22: 3311-3317.
- van de Wetering P, Cherng JY, Talsma H, Crommelin DJ, and Hennink WE. 1998. *2-(Dimethylamino)ethyl methacrylate based (co)polymers as gene transfer agents. J Control Release* 53: 145-53.
- van de Wetering P, Moret EE, Schuurmans-Nieuwenbroek NM, van Steenberg M, and Hennink WE. 1999. *Structure-activity relationships of water-soluble cationic methacrylate/methacrylamide polymers for nonviral gene delivery. Bioconjug Chem* 10: 589-97.
- Wagner RW, Matteucci MD, Lewis JG, Gutierrez AJ, Moulds C, and Froehler BC. 1993. *Antisense gene inhibition by oligonucleotides containing C-5 propyne pyrimidines. Science* 260: 1510-3.
- Wang Q, and Finer MH. 1996. *Second-generation adenovirus vectors. Nat Med* 2: 714-6.
- Weber M, Moller K, Welzeck M, and Schorr J. 1995. *Short technical reports. Effects of lipopolysaccharide on transfection efficiency in eukaryotic cells. Biotechniques* 19: 930-40.
- Weintraub H, Cheng PF, and Conrad K. 1986. *Expression of transfected DNA depends on DNA topology. Cell* 46: 115-22.
- Wilke M, Fortunati E, van den Broek M, Hoogeveen AT, and Scholte BJ.

1996. *Efficacy of a peptide-based gene delivery system depends on mitotic activity.* *Gene Ther* 3: 1133-42.

Wittaker G, Bui M, and Helenius A. 1996. *The role of nuclear import and export in influenza virus infection.* *Trends Cell Biol.* 6: 67-71.

Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, and Felgner PL. 1990. *Direct gene transfer into mouse muscle in vivo.* *Science* 247: 1465-8.

Wu GY, and Wu CH. 1988. *Receptor-mediated gene delivery and expression in vivo.* *J Biol Chem* 263: 14621-4.

Xu Y, and Szoka FC, Jr. 1996. *Mechanism of DNA release from cationic liposome/DNA complexes used in cell transfection.* *Biochemistry* 35: 5616-23.

Yang NS, Burkholder J, Roberts B, Martinell B, and McCabe D. 1990. *In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment.* *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 9568-72.

Yu L, Nielsen M, Han SO, and Wan Kim S. 2001. *TerplexDNA gene carrier system targeting artery wall cells.* *J Control Release* 72: 179-89.

Zabner J, Fasbender AJ, Moninger T, Poellinger KA, and Welsh MJ. 1995. *Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid.* *J Biol Chem* 270: 18997-9007.

Zelphati O, and Szoka FC, Jr. 1996. *Intracellular distribution and mechanism of delivery of oligonucleotides mediated by cationic lipids.* *Pharm Res* 13: 1367-72.

Zhang X, Collins L, and Fabre JW. 2001. *A powerful cooperative interaction between a fusogenic peptide and lipofectamine for the enhancement of receptor-targeted, non-viral gene delivery via integrin receptors.* *J Gene Med* 3: 560-8.

Zhou X, and Huang L. 1994. *DNA transfection mediated by cationic liposomes containing lipopolylysine: characterization and mechanism of action.* *Biochim Biophys Acta* 1189: 195-203.